



DOBLE GRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y CIENCIAS AMBIENTALES

Trabajo de Fin de Grado

FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**Bioensayos de acumulación de nanopartículas de plata (Ag NPs) en
larvas de dorada (*Sparus aurata*)**



Alumna: Gara Fernández López

Tutoras: M^a Dolores Galindo Riaño y M^a Dolores Granado Castro

Puerto Real, 30 de noviembre de 2018

BIOENSAYOS DE ACUMULACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA (Ag NPs) EN LARVAS DE DORADA (*Sparus aurata*)

TRABAJO DE FIN DE GRADO

realizado en la

FACULTAD DE CIENCIAS – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

Memoria presentada por la alumna Gara Fernández López para la obtención del PCEO de Grado en Ciencias del Mar y Grado en Ciencias Ambientales de la Universidad de Cádiz.

Puerto Real, 30 de noviembre de 2018

Resumen

En las últimas décadas se ha identificado como una amenaza global grave la contaminación por metales pesados, tanto en el medio acuático como en el terrestre. De ahí el interés por estudiar su comportamiento, los posibles efectos y las formas de mitigación de la contaminación que puedan producir éstos. Por otro lado, el empleo de nanomateriales en la industria cada vez es más frecuente, abarcando diversos ámbitos en la industria, mejorando productos ya existentes o empleándose en el diseño de materiales innovadores.

Un ejemplo significativo son las nanopartículas metálicas que, debido a sus propiedades estructurales, electrónicas, ópticas y catalíticas, han despertado un especial interés, además de ofrecer una gran variedad en función del metal y la forma química en la que se encuentren. No obstante, y a pesar de su gran utilidad, son consideradas como “*contaminantes emergentes peligrosos*” debido fundamentalmente al incremento en los últimos años de la industria nanotecnológica y la potencial peligrosidad de los elementos metálicos que las constituyen.

Entre ellas, destacan las nanopartículas de plata (AgNPs) por su gran versatilidad y uso extendido en la industria, así como en aplicaciones biomédicas, como agente microbiano (bactericida-fungicida) o para marcaje celular.

Por ello, en este trabajo se propone el estudio comparativo a escala de laboratorio del efecto de la exposición a plata, tanto en forma iónica como en forma de nanopartícula, en larvas de dorada (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758). Para ello se propone realizar bioensayos de toxicidad aguda durante 5 días adicionando diferentes concentraciones de ambas formas químicas. Paralelamente, se evalúa el comportamiento y evolución de las AgNPs en el agua de mar en ausencia de larvas ya que su adición en el agua de mar puede alterar la forma física de las nanopartículas y provocar fenómenos de agregación o precipitación.

De este modo se pretende valorar el efecto que tendría la presencia de plata en los ecosistemas acuáticos, evaluando su bioacumulación en organismos como las larvas, y determinar si la forma química en la que se encuentre el metal en el medio acuático pudiera incrementar o disminuir su efecto.

Abstract

In the last decades, the contamination caused by heavy metals, both in aquatic and terrestrial environments, has been identified as a serious global threat. That is why there is an increasing interest in studying their behavior, the possible effects and the ways of mitigate the pollution that may occur.

On the other hand, the use of nanomaterials in the industry has become more frequent in the improvement of existing products and the production of innovative materials. Metal nanoparticles are of great interest due to their structural, electronic, optical and catalytic properties. However, despite their great usefulness, they are considered as "dangerous emerging pollutants" mainly due to the rise in the nanotechnology industry in the last years and the potential risk of the metals that constitute them.

Among all of them, silver nanoparticles (*AgNPs*) stand out for their great versatility and widespread use in the industry, as well as in biomedical applications as a microbial agent (bactericidal-fungicide) or for cellular marking.

Therefore, in this research work we propose the comparative study on laboratory scale of the effect of the exposure to silver, both in ionic form and as a nanoparticle, in gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758). For this purpose, acute toxicity bioassays are proposed to be carried out for 5 days adding different concentrations of both chemical forms. The behavior and evolution of *AgNPs* in seawater is also evaluated in the absence of larvae species since they can interfere in the physical form of the nanoparticles and may cause aggregation or precipitation phenomena.

Thus, the effect of silver on aquatic ecosystems has been assessed by evaluating its bioaccumulation in larvae species, and determining if the chemical form of the metal could increase or decrease its effect.

1. Introducción

1.1. Generalidades de la dorada

La dorada (*Sparus aurata*, Linneaus, 1758) (Figura 1.1), es un teleósteo perteneciente a la familia *Sparidae* y orden perciforme. Entre los espáridos más conocidos se puede encontrar el sargo (*Diplodus sargus sargus*), la mojarra (*Diplodus vulgaris*), la herrera (*Lithognathus mormyrus*) y el pargo (*Pagrus pagrus*) o la salema (*Sarpa salpa*) entre otros.



Figura 1.1. Dorada (*Sparus aurata*) [FAO, 2018]

Esta especie es común en el mar Mediterráneo, encontrándose también en las costas orientales del Océano Atlántico, desde Inglaterra hasta Senegal. Se caracteriza por ser eurihalina y euriterma, por lo que puede vivir tanto en el mar como en lagunas costeras o zonas estuáricas, sobre todo durante las primeras fases de su ciclo de vida. La eclosión de los huevos tiene lugar durante los meses de octubre y diciembre en mar abierto, después los juveniles migran en primavera buscando zonas más cálidas ya que es una especie muy sensible a las bajas temperaturas. A finales de otoño, los adultos regresan a mar abierto donde realizan la puesta comenzando el ciclo nuevamente [Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2018].

En mar abierto pueden vivir en praderas de algas como la *Posidonia oceánica* o en fondos rocosos o arenosos. Los juveniles nadan en profundidades no superiores a 30 metros, mientras que los adultos se sumergen hasta profundidades mucho mayores.

Es un animal hermafrodita con inversión sexual: durante los primeros dos años es un macho funcional y después se convierte en hembra. La madurez se alcanza a los 2 años en machos y entre los 2 y 3 en hembras. Las puestas se producen de manera asincrónica y suelen ser de entre 20000 y 80000 huevos cada día durante un periodo de hasta 4 meses [Zohar y col., 1978]. Se alimenta básicamente de ostras, mejillones y mariscos, aunque en ocasiones tiene comportamiento herbívoro.

Los principales rasgos biológicos que presenta esta especie son: la presencia de un cuerpo oval, alargado y comprimido lateralmente. La cabeza es curvada con ojos pequeños, boca baja y oblicua y labios gruesos. Tiene de 4 a 6 caninos en cada mandíbula, seguidos de dientes romos que le sirven como molares y que se disponen de 2 a 4 filas. El color es gris plateado con una gran mancha negra que va desde el origen de la línea lateral hasta el margen superior del opérculo que está bordeado por un área rojiza. A la altura de los ojos tiene una banda frontal dorada, bordeada por dos áreas oscuras (no bien definidas en los individuos jóvenes). Además, presenta líneas longitudinales oscuras sobre los costados del cuerpo y una banda oscura también sobre la aleta dorsal y puntas de la aleta caudal [FAO, 2018].

Esta especie demostró muy rápidamente una alta adaptabilidad a las condiciones de piscicultura intensiva, especialmente en la zona mediterránea. Su estilo de vida, posición en la cadena trófica y facilidad de cultivo han determinado que la dorada haya sido elegida como un modelo biológico privilegiado en estudios de ecotoxicología del medio marino [Kaya y col., 2015], por lo que será estudiada en este trabajo.

1.2. Metales pesados en el medio acuático

El término de “metal pesado” tiene hoy en día un uso a veces impreciso, ya que aunque su definición incluye aquellos elementos metálicos con una densidad relativamente alta, con valores superiores a 5 g cm^{-3} , a veces se emplea refiriéndose a elementos tóxicos y presentes en el medio en concentraciones traza.

La contaminación por metales pesados tanto del suelo como del agua ha sido identificada como una amenaza global grave en las últimas décadas, coincidiendo con el inicio de la revolución industrial, el incremento en el uso de pesticidas y abonos para la industria agrícola, el crecimiento de las poblaciones costeras, etc. [Oyewole Salawu y col., 2018].

En el medio acuático, la contaminación por metales y semimetales de mayor importancia toxicológica suele ser debida a mercurio, arsénico, cromo, plomo, cadmio, níquel y cinc. Su presencia puede ser de origen natural debido fundamentalmente a emisiones atmosféricas por parte de volcanes, procesos de meteorización, desgaste mecánico y/o químico de minerales, etc., o bien de origen antropogénico, si las emisiones

son debidas a actividades humanas como la agricultura, ganadería, transporte, entre otras [Bradl, 2005; Zhou, 2008].

El exceso de estos elementos en el planeta plantea graves riesgos para la salud de los seres humanos, además de para otras formas de vida debido a la bioacumulación a lo largo de la cadena alimenticia [Rajeshkumar y col., 2018]. El término “bioacumulación” hace referencia al aumento progresivo de la cantidad de una sustancia en el organismo cuando la ingesta de dicha sustancia supera la capacidad que tiene el cuerpo de eliminarla [Yarsan y col., 2013]. Pero además de esta respuesta por parte del organismo, se pueden producir otros efectos como la bioconcentración o biomagnificación [Nordberg y col. 2009], que se definen como:

- ❖ Bioconcentración: proceso o conjunto de procesos que generan mayor concentración de una sustancia en el organismo que en el medio que lo rodea.
- ❖ Biomagnificación: aumento en la concentración de una sustancia según se alcanzan niveles tróficos superiores como resultado de los procesos de bioconcentración y bioacumulación.

Es por este motivo que deben adoptarse medidas para reducir la cantidad de estos elementos en las aguas, consiguiendo llegar a niveles aceptables que cumplan con las normativas vigentes [Kobielska, 2018]. Por otro lado, el desarrollo de métodos de detección que permitan su monitoreo y control también son aspectos cruciales a tener en cuenta.

Como consecuencia de la alta toxicidad de muchos metales y semimetales, incluso a niveles bajos de concentración y su tendencia a la bioacumulación, el medio acuático es muy sensible a estos contaminantes [Censi y col., 2006]. Son comunes en el medio marino contaminado pudiendo ser encontrados en forma disuelta o particulada [Yipel y col., 2017]. La fracción particulada puede dar lugar a procesos de precipitación, adsorción o incorporación a las especies marinas [Alomary y col., 2007]. Así, los organismos marinos suelen incorporar estos elementos en su organismo directamente del medio por la ingesta de agua, a través del alimento, al comerse a otros animales que ya contengan dichas sustancias en su interior, y/o por contacto directo con el agua o incluso con sedimentos [Andreani y col., 2008].

1.3. La plata y su toxicidad

La plata es un elemento químico, cuyo símbolo es Ag, su número atómico es 47 y su masa atómica es 107,870. Presenta un color lustroso blanco grisáceo y desde el punto de vista químico es uno de los metales pesados nobles. Existen 25 isótopos de la plata, cuyas masas atómicas varían entre 102 y 107 [Holler y col., 2015]. Este elemento es difícil de encontrar en la corteza terrestre. Su abundancia debida a fuentes naturales es aproximadamente de $0,07 \text{ mg kg}^{-1}$, encontrándose principalmente en el basalto y las rocas ígneas, en forma de cloruro, sulfuro o nitrato. Este valor tiende a elevarse en el petróleo crudo y en el agua de las fuentes termales y géiseres. Las concentraciones de plata en ríos, lagos y estuarios suelen ser de $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ para zonas no contaminadas y de $0,01 - 0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ en áreas urbanas e industrializadas [Howe y col., 2002]. Los efluentes antropogénicos con elevadas concentraciones de plata suelen ser debidos a actividades de fundición, zonas con desechos peligrosos, emisarios de aguas residuales, industrias siderúrgicas, industria fotográfica, etc. [Eisler, 2009].

Debido a que la plata pura es demasiado dura, se suele utilizar como aleaciones con cobre para la fabricación de elementos decorativos como joyería, monedas, cubertería, etc. También se emplea en baterías de gran capacidad, en piezas de motores o en aquellas ocasiones en las que se requiere de un material que sea resistente al ácido acético, como en los recipientes empleados en la industria del vinagre o la sidra. Otro uso importante de la plata, en forma de nitrato de plata (AgNO_3), es en la fabricación de espejos, así como antiséptico, tintas indelebles, desinfectante de agua, etc., y hasta hace unos pocos años en la fotografía [Nordberg y col., 2017].

Los efectos tóxicos de la plata son diversos, destacando los siguientes:

- ❖ Efectos en animales: en este aspecto, la exposición de animales de forma continua a la plata puede producir anemia, ensanchamiento del músculo cardíaco, retraso del crecimiento, y cambios degenerativos en el hígado [Holler y col., 2015].
- ❖ Efectos en humanos: las sales de plata pueden ser absorbidas lentamente por algunos tejidos ocasionando una coloración gris azulada, sobre todo en aquellas áreas expuestas a la luz como la piel, lo que se conoce como argiria [Holler y col., 2015]. Su uso en forma de polvo sólido es peligroso para los ojos, pudiendo producir quemaduras en la córnea, argiria en los tejidos del ojo, o incluso ceguera. Su ingesta es muy peligrosa ya que precipita en los tejidos en estado metálico y

no se puede eliminar del organismo. La exposición a altas concentraciones de vapor de plata puede causar mareos, dificultades para respirar, dolores de cabeza o irritación respiratoria. Si las concentraciones son extremadamente altas los efectos que pueden producir son somnolencia, espasmos, confusión, inconsciencia, coma o incluso la muerte. Si se ingiere, provoca náuseas, vómitos, diarrea, neumonitis, etc., presentando una toxicidad moderada, aunque si dicha exposición es constante o lo suficientemente elevada, puede llegar a ser mortal [Nordberg y col., 2017].

- ❖ Efectos en el medio ambiente: el nitrato de plata es un poderoso agente oxidante, que puede presentar riesgo de incendio, además de ser muy corrosivo, cáustico y venenoso. La mayor parte de la plata que accede al medio ambiente se incorpora a los ecosistemas terrestres, donde se inmoviliza por precipitación en sales insolubles y por complejación o adsorción sobre materia orgánica, arcillas y óxidos de hierro y manganeso, afectando de forma destacada a los terrenos agrícolas. También se ve afectado el medio acuático, en donde un aumento en la salinidad para aguas salobres y marinas, provoca la formación de complejos de cloro-plata (AgCl , AgCl_2^- , AgCl_3^{2-} , AgCl_4^{3-}), lo que permite que algo de plata permanezca en forma disuelta en las aguas [Howe y col., 2002].

1.4. Nanopartículas o nanomateriales

El uso reciente de nanomateriales en la industria es cada vez mayor y su interés radica en las propiedades físicas y químicas únicas que presentan estas sustancias debido a su tamaño, con un incremento considerable en la relación superficie/volumen que da lugar a una mayor relevancia de los fenómenos de superficie frente a los procesos químicos y físicos clásicos [Riu y col., 2006], lo que podría incrementar su toxicidad.

La Comisión Europea (CE) ha trabajado en los últimos años en la propuesta de una definición para el término “nanomaterial” o “nanopartícula”, que fuera común en todos los países de la Unión Europea. Esta definición se basa en el tamaño de las partículas de dichos materiales y tiene como objeto garantizar la creación de un marco normativo común entorno a su seguridad. Como resultado de estos trabajos, la Organización Internacional de Normalización, en el documento de Recomendación de la Comisión Europea 2011/696/UE [European Commission, 2011. Diario de la Unión Europea de 20/10/2011 (275/38)], define los nanomateriales o nanopartículas como

aquellos materiales de origen natural, accidental o manufacturado que tengan cualquier dimensión externa en la nanoescala o con una estructura interna o superficial en la nanoescala. El término “nanoescala” se define como intervalo de tamaños entre aproximadamente 1 nm y 100 nm. A su vez, las nanopartículas (NPs) son partículas con al menos una dimensión entre 1 y 100 nm [Bondarenko y col., 2013], pudiéndose presentar tanto sueltas, agregadas o aglomeradas. En la Unión Europea, se cuenta con la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (EACH) que regula, entre otros, los nanomateriales mediante el Reglamento REACH (Reglamento Europeo sobre sustancias químicas) y el CLP (Reglamento que armoniza los criterios para la clasificación de sustancias y mezclas, y las normas de etiquetado y envasado para sustancias y mezclas peligrosas) [Sánchez Moreno, 2017].

Las fuentes más comunes de nanopartículas en el medio ambiente pueden ser naturales o derivadas de actividades antropogénicas intencionales o accidentales, y pueden verse resumidas en la Tabla 1.1 [Ávalos y col., 2013]. En teoría, las NPs pueden ser producidas a partir de casi cualquier producto químico, sin embargo, la mayoría de las NPs que se emplean en la actualidad han sido fabricadas a partir de metales de transición, silicio, carbono y óxidos de metal.

Tabla 1.1. Fuentes comunes de nanopartículas en el medio ambiente (tabla modificada de la de Smita [Smita y col., 2012])

| Fuentes (liberación de nanopartículas al medio ambiente) | | |
|---|---|---|
| Natural | Accidental | Intencional |
| <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fuego forestal ▪ Erupción volcánica ▪ Polvo mineral del Sahara ▪ Erosión del suelo por viento/agua | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Emisiones de vehículos ▪ Carbón/petróleo/gas de calderas ▪ Pilas de combustible ▪ Diferentes procesos industriales | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Ingeniería de nanopartículas en varias aplicaciones industriales ▪ Remediación de aguas subterráneas ▪ Suministro de medicamentos ▪ Diagnóstico ▪ Imágenes biomédicas |

1.4.1. Nanopartículas metálicas (NPMs) y nanopartículas de plata (AgNPs)

1.4.1.1. Características y aplicaciones

La naturaleza de las NPs es diversa, destacando aquellas que contienen algún elemento metálico (NPMs). Pueden presentar diferente composición química (metal, óxido metálico, sulfuro metálico, etc., con o sin recubrimiento adicional). Es muy significativo el auge y gran interés de su uso en las últimas décadas, aunque en realidad ya existían y eran usadas desde hace varios siglos [Gutiérrez, 2005]. Por ejemplo, en la cultura egipcia se usaban nanopartículas de oro como coloides medicinales para conservar la juventud y mejorar la salud; en China, además de con fines medicinales, también se empleaban como colorantes en porcelana [Cao, 2004]. Hoy en día se utilizan en centenares de aplicaciones y productos de consumo, tales como baterías, pinturas, gasas, ropa, etc.

El conocimiento de las propiedades y las características que presentan las NPs ha hecho posible aplicarlas en áreas muy diversas. Algunas de estas características son:

- ❖ Elevada relación superficie/volumen que favorece de forma significativa los fenómenos superficiales frente a los procesos físicos y químicos clásicos, como pueden ser la reactividad química o la temperatura de fusión [Israelachvili, 2011]. Esta relación superficie/volumen tan grande implica que un gran número de los átomos contenidos en una nanopartícula se encuentra en su superficie. Debido a dicha característica, son ideales para usarse en materiales compuestos, materiales catalíticos, portadores de fármacos y materiales para almacenamiento de energía [Ciencia y Desarrollo revista, 2016].
- ❖ Absorción óptica característica de la nanopartícula, dependiendo de su naturaleza. Así, sus suspensiones tienen un comportamiento óptico específico, pudiendo cambiar de color en función de si la luz con la que se observa es reflejada o si la luz es transmitida a través de éstas [Ratner, 2003].
- ❖ Si tienen poder bactericida, éste aumenta gracias a la mayor relación superficie/tamaño. Así, al tener un tamaño menor presentan mayor superficie de contacto y su efecto es mayor [Pal y col., 2007].
- ❖ Propiedades eléctricas especiales, debido al movimiento característico de los electrones en el espacio reducido que ofrece el nanomaterial, lo que da lugar a propiedades específicas del material [Sun y Xia, 2002].

Todas estas propiedades las presentan las nanopartículas de plata (AgNPs), destacando su especial versatilidad, lo que permite su aplicación en optoelectrónica, catálisis, procesos de remediación ambiental, etc. Por otro lado, estas nanopartículas también destacan por sus aplicaciones biomédicas basadas en sus propiedades ópticas, eléctricas, mecánicas y estructurales, como un gran agente microbiano (bactericida-fungicida), para marcaje celular, etc. [Gómez Quintero y col., 2013]. Gracias a las propiedades antimicrobianas de las AgNPs, su uso en el ámbito médico cada vez es más significativo, destacando su incorporación en apósitos para heridas, en dispositivos anticonceptivos, en la fabricación de instrumental quirúrgico y para prótesis óseas [Cohen y col., 2007]. Además, en enfermos afectados por el virus VIH-1, se ha demostrado que el tratamiento *in vitro* con AgNPs interacciona con el virus e inhibe su capacidad para unirse a las células del huésped [Elechiguerra et al., 2005].

Las AgNPs también se usan en la fabricación de aerosoles, detergentes, frigoríficos, lavadoras, chupetes, sistemas de purificación de aguas, pinturas para paredes y productos cosméticos [Zhang y Sun, 2007], prendas de vestir, ropa interior y calcetines [Lee y col., 2007]. En la industria textil, las AgNPs se emplean con gran éxito en la fabricación de tejidos antimicrobianos y antiolor. Así, al ser introducidas en las fibras sintéticas o naturales de los tejidos, se potencia su actividad iónica, y se pueden liberar poco a poco, produciendo durante su uso un número significativo de iones plata de forma continuada [Chen and Chiang, 2008; Ávalos y col., 2013]. Con respecto al sector alimentario, las AgNPs son empleadas en agricultura para prolongar la conservación de frutas y otros productos, aprovechando su efecto antibacteriano y fungistático; igualmente, y con la misma finalidad, se utilizan en el envasado de algunos alimentos [Aguilar, 2009; Ávalos y col., 2013].

Por lo tanto, se puede decir que las AgNPs presentan muchas aplicaciones y usos, aumentando en popularidad conforme avanzan los años [Mahdi y col., 2017].

Las AgNPs pueden presentarse de diversas formas (Figura 1.2), pero está demostrado que las que tienen forma triangular son las que presentan mayor efecto bactericida [Rai y col., 2009]. Esta morfología depende principalmente de la temperatura, el flujo del material y otra serie de parámetros que se establecen en el momento de su fabricación. Según Ávalos y col., 2013, en un informe de investigación de mercado realizado por la empresa *Bourne Research*, se indica que las AgNPs se están convirtiendo

en uno de los productos con mayor crecimiento de uso en la industria de la nanotecnología.

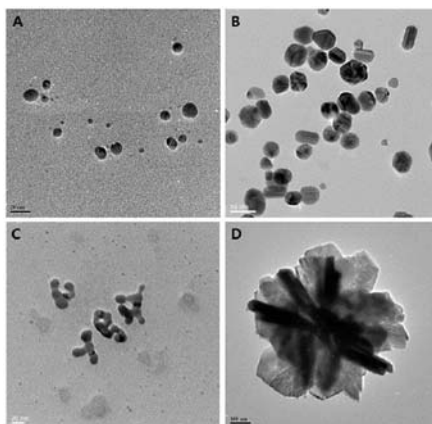


Figura 1.2. *Diversas formas de AgNPs obtenidas mediante síntesis biológica: (A) forma esférica; (B) poblaciones mixtas (octogonales, de varillas, hexagonales e icosaédricas); (C) poblaciones altamente ramificadas; (D) en forma de flor [Zhang y col., 2016]*

1.4.1.2. Riesgos tóxicos de las nanopartículas metálicas

Existen pocos estudios avanzados que traten la toxicidad de las NPMs, los efectos nocivos de este tipo de materiales en el medio terrestre, así como su impacto en el medio acuático; además, su caracterización y cuantificación en aguas suele ser prácticamente inexistente.

En la actualidad, las NPMs son consideradas “*contaminantes emergentes peligrosos*” debido fundamentalmente al incremento en los últimos años de la industria nanotecnológica, así como su potencial peligrosidad [Munari y col., 2014]. Además, su comportamiento tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos y sus efectos ecotoxicológicos, dependerán de la forma física y química que adopten y su interacción con el medio, ya que pueden encontrarse en la naturaleza con diferentes composiciones (sulfuros, óxidos, metales,...) y características. Suelen llegar a los ecosistemas acuáticos a través de las aguas residuales, tanto industriales como urbanas, o debido a las emisiones atmosféricas y tienden a disolverse o sufrir procesos de agregación y posterior acumulación en los sedimentos. Actualmente es motivo de preocupación la amplia dispersión que se puede generar con estos materiales debido a su uso cada vez más extendido en productos de higiene personal, textil y otros materiales industriales, o como catalizadores de combustible [Gómez-Mendikute y col., 2013]. La toxicidad de las

nanopartículas depende, entre otros factores, de su persistencia en los órganos de los seres vivos en los que se depositan y de si éstos pueden defenderse mediante una respuesta biológica que las elimine [Gutiérrez-Praena, 2009].

Por todo ello, en los últimos años ha surgido la *nanoecotoxicología* como la ciencia dedicada a estudiar y mitigar el impacto que las NPs generan sobre el medio ambiente. Estos estudios se pueden realizar mediante bioensayos toxicológicos que emplean biomarcadores moleculares, bioquímicos, tasas de mortalidad, etc. No obstante, deberían de realizarse empleando ensayos de toxicidad estándar y aplicando protocolos definidos según la tipología de las NPs objeto de estudio, para que los resultados pudieran ser comparables. Como indica Ávalos y col. [Ávalos y col., 2013], algunos estudios han mostrado que la toxicidad intrínseca de las AgNPs depende de factores como el tamaño, la forma, el área superficial, la carga superficial, la solubilidad y el estado de agregación. Asimismo, numerosas investigaciones *in vitro* indican que las AgNPs son tóxicas para las células de los mamíferos. Igualmente se ha observado que la exposición a AgNPs tiene consecuencias oxidativas y genotóxicas, originando también procesos inflamatorios.

La exposición en humanos a AgNPs puede darse por vía oral, respiratoria o dérmica [Johnston y col., 2010], y/o a través del tracto genital femenino, debido esto último a que este tipo de NPs se están incorporando en algunos productos de higiene íntima [Zhang y Sun, 2007].

1.5. Bioensayos de toxicidad

Los estudios de toxicidad de una sustancia se pueden llevar a cabo mediante diferentes métodos. Destacan los ensayos de toxicidad aguda que evalúan el efecto de la exposición a niveles elevados del contaminante en condiciones de laboratorio para caracterizar en poco tiempo el impacto que pudiera provocar en los organismos objeto de estudio. Durante los bioensayos, los organismos (en el caso de este Trabajo de Fin de Grado se estudian larvas de dorada) son sometidos a la acción continuada y significativa de uno o varios contaminantes a diferentes concentraciones (en este trabajo se evalúa el efecto de plata iónica y nanopartículas de plata). Al agregar una cantidad controlada del tóxico sobre el medio, los organismos de estudio se ven alterados química y biológicamente. A partir de la observación de estas alteraciones, se pueden evaluar los efectos toxicológicos que produce la presencia de la sustancia tóxica sobre dichos

organismos, además de la capacidad que tienen las especies de soportar la exposición al tóxico [Jones, 2009].

En la Tabla 1.2 aparecen recogidos algunos de los estudios realizados recientemente, en los cuales se compara la toxicidad de la plata en su forma iónica y como nanopartículas en diferentes especies. La mayor parte de los estudios, tras someter distintos organismos a la acción de Ag^+ y AgNPs, llegan a las mismas conclusiones:

- ❖ Las AgNPs son menos tóxicas que la presencia de plata iónica (Ag^+). Mientras que las AgNPs causan malformaciones y retraso en el desarrollo, la presencia de Ag^+ induce principalmente malformaciones seguidas de una disminución en el desarrollo del organismo con posibilidades de muerte.
- ❖ Los mecanismos de acción de las AgNPs parecen ser distintos de los de Ag^+ .
- ❖ La exposición continuada a AgNPs da lugar a cierta acumulación de Ag^+ y alteraciones fisiológicas en los organismos expuestos.
- ❖ Parece que el principal mecanismo tóxico de las AgNPs se debe primero a un proceso de acumulación de plata seguido de la respuesta al estrés molecular y oxidativo a nivel celular.

Tabla 1.2. Especies estudiadas en ensayos toxicológicos expuestas a AgNPs y Ag^+

| Espece de estudio | Referencia |
|---|------------------------------|
| Distintos tipos de suelos | Hashimoto y col., 2017 |
| <i>H. verticillata</i> (planta), <i>Radix spp.</i> (gasterópodo) y <i>G. affinis</i> (pez “mosquito”) | Jiang y col., 2017 |
| <i>Daphnia magna</i> (crustáceo “dafnia”) | Ribeiro y col., 2017 |
| <i>Cucumis sativus</i> (planta) | Tripathi y col., 2017 |
| <i>Eisenia andrei</i> (“lombriz “roja”) | Velicogna y col., 2017 |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> (mejillón) | Auguste y col., 2018 |
| <i>Danio rerio</i> (pez “cebra”) | Cambier y col., 2018 |
| <i>Escherichia coli</i> (bacteria) | Choy y col., 2018 |
| <i>Phanerochaete chrysosporium</i> (hongo) | Huang y col., 2018 |
| <i>Cyprinus carpio</i> (“pez carpa”) | Khosravi-Katuli y col., 2018 |
| <i>Dunaliella salina</i> (microalga) | Johari y col., 2018 |
| <i>Oryzias latipes</i> (pez “Medaka”) | Kataoka y col., 2018 |
| <i>Danio rerio</i> (pez “cebra”) | Lacave y col., 2018 |
| Trigo y girasoles | Pardha-Saradhi y col., 2018 |

2. Objetivos

El principal objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es el estudio a escala de laboratorio del efecto de la exposición a un metal en dos formas químicas diferentes mediante bioensayos de toxicidad aguda. El elemento estudiado es plata en forma iónica y como nanopartículas. La especie elegida es la dorada (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) en estadio larvario, debido a su fácil disponibilidad en la zona y su gran interés comercial. Este objetivo se desarrolla mediante los siguientes estudios:

- a) Diseño y desarrollo de bioensayos de exposición a plata iónica (Ag^+) y nanopartículas de Ag con larvas de dorada, para diferentes concentraciones de metal y distintos tiempos de exposición.
- b) Control diario de los parámetros físico-químicos del agua de los tanques de los ensayos, evaluando: temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad y sólidos totales disueltos.
- c) Cuantificación de la concentración de plata en el agua de los tanques de ensayo durante los test de toxicidad, con objeto de realizar un seguimiento del elemento en las dos formas químicas que se comparan en este estudio.
- d) Cuantificación de los niveles de plata en los tejidos de las larvas sometidas a exposición del metal en las dos formas químicas seleccionadas para diferentes concentraciones.
- e) Estudio del comportamiento y evolución de las AgNPs en el agua de mar en ausencia de larvas de forma similar a como se hacen los bioensayos. Se controlan los parámetros físico-químicos del medio y se analiza la evolución a lo largo del tiempo de la concentración de metal en muestras de agua de mar sin pretratar, agua filtrada y agua filtrada y centrifugada.
- f) Discusión de los resultados.

Otro objetivo planteado en este trabajo es el conocimiento de técnicas de análisis aplicadas a muestras ambientales y la mejora en la destreza en su manejo, destacando la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) y la espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito (GF-AAS). De igual forma, se emplean diversos métodos de pretratamiento de estas muestras ambientales, como filtrado, liofilización, homogenización y digestión ácida asistida por microondas.

3. Material y métodos

3.1. Reactivos empleados

Todos los reactivos utilizados en este trabajo fueron de la mayor pureza necesaria para cada tipo de estudio, para análisis o Suprapur según el nivel de concentración del analito en las muestras. El agua ultrapura utilizada se obtuvo por ósmosis inversa con un equipo Elix 3 (Milli-RO) acoplado a un equipo Milli-Q50® (18 MΩ cm) de desionización por intercambio iónico (Millipore, EE UU).

3.2. Diseño de los ensayos de toxicidad

3.2.1. Ensayos con larvas de dorada

Para realizar este trabajo se diseñaron bioensayos estáticos de toxicidad aguda con larvas de dorada (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) expuestas a distintas concentraciones de plata iónica y nanopartículas de plata. Se emplearon estos organismos en su estadio larvario por ser más sensibles al efecto de cualquier sustancia tóxica que en estadios superiores. La exposición se realizó durante 5 días en las instalaciones del Servicio Central de Investigación en Cultivos Marinos, que se encuentra en el Centro Andaluz de Estudios Marinos (CASEM) de la Universidad de Cádiz, en junio de 2017 (Figura 3.1). Durante los días previos a los bioensayos, las larvas fueron aclimatadas en tanques de cría en las condiciones ambientales de la planta de cultivos.

Las condiciones de los bioensayos fueron las siguientes:

- ❖ Uso de 40 tanques de polietileno tereftalato (PET 01).
- ❖ Adición de 1,5 L de agua de mar, con aireación continua por bombeo.
- ❖ Adición de 50 individuos por tanque, con un peso medio $\approx 0,08$ g /individuo.
- ❖ Fotoperíodos de 12/12 horas de luz/oscuridad y temperatura ambiente.
- ❖ Renovación diaria del 50% del agua de los tanques, después de realizar la toma de muestra diaria para el control y análisis de las aguas. El primer día, para la caracterización del agua de los tanques en las condiciones iniciales ($t = 0$ h), solo se extrajo y renovó el 16,7% del agua de cada tanque.

- ❖ Alimentación de las larvas con pienso comercial, 5% biomasa total/tanque/día (GEMMA Micro 500 Micras).



Figura 3.1. Ensayos de toxicidad de larvas de dorada en presencia de Ag^+ y AgNPs

Los ensayos se realizaron de forma paralela tanto para la exposición a plata iónica a partir de $AgNO_3$ como para la exposición a nanopartículas de plata. En ambos casos, se utilizaron 20 tanques de agua distribuidos en dos series para las exposiciones de 24 horas (tanques: 1 a 10) y de 96 horas (tanques: 11 a 20), con una muestra control y 4 concentraciones para cada serie, realizando 2 réplicas por concentración (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Concentraciones adicionadas de metal en los tanques y su numeración según el tiempo de exposición (n° réplicas = 2)

| Tiempo de exposición | 24 h | | | | |
|---------------------------|-----------|------------------|-------------------|--------------------|---------------|
| Concentraciones nominales | Control | $1 \mu g L^{-1}$ | $10 \mu g L^{-1}$ | $100 \mu g L^{-1}$ | $1 mg L^{-1}$ |
| N° tanque | Tanque 1 | Tanque 2 | Tanque 3 | Tanque 4 | Tanque 5 |
| | Tanque 6 | Tanque 7 | Tanque 8 | Tanque 9 | Tanque 10 |
| Tiempo de exposición | 96 h | | | | |
| Concentraciones nominales | Control | $1 \mu g L^{-1}$ | $10 \mu g L^{-1}$ | $100 \mu g L^{-1}$ | $1 mg L^{-1}$ |
| N° tanque | Tanque 11 | Tanque 12 | Tanque 13 | Tanque 14 | Tanque 15 |
| | Tanque 16 | Tanque 17 | Tanque 18 | Tanque 19 | Tanque 20 |

Diariamente se midieron los parámetros físico-químicos de todos los tanques: temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad y sólidos totales disueltos (TDS) mediante una sonda multiparamétrica (HI 9828, Hanna Instruments, España), calibrada antes de su uso. Después se hacía el recuento de la cantidad de larvas vivas y muertas, siendo retiradas estas últimas. Tanto las larvas muertas como los desechos que iban quedando cada día en el fondo de los tanques, eran retirados usando un tubo rígido de FEP (Cole-Parmer, HV-06450-07) conectado a un tubo flexible de C-Flex (Cole-Parmer, HV-06424-71), dispuesto en una bomba peristáltica (Masterflex E/S Portable Sampler HV-07571-00, Cole-Parmer Instrument Co. EEUU). Este sistema también se usó para la toma de muestra de agua durante la renovación diaria, evitando la succión de las larvas vivas.

3.2.2. Ensayos sin larvas

Con objeto de estudiar el comportamiento de las nanopartículas en el agua de mar de los tanques desde un punto de vista químico, se realizaron ensayos similares sin la presencia de larvas. Para ello se seleccionaron las condiciones del tanque control, y las de los tanques con concentraciones de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ y 1 mg L^{-1} de nanopartículas de plata. Diariamente se evaluaron los parámetros físico-químicos, así como la concentración metálica (tiempo: 0, 24, 48, 72 y 96 horas), para un mejor control de la evolución de las NPs de Ag. La renovación diaria del agua de los tanques se realizó de igual forma que en el caso de los bioensayos con larvas, y se aplicaron las mismas condiciones de luz, aireación y temperatura ambiente, sin adicionar alimentación.

3.3. Preparación de las disoluciones de nanopartículas de plata (AgNPs)

En los ensayos con AgNPs se utilizó plata coloidal, con tamaño de partícula $<100 \text{ nm}$ (N° CAS 7440-22-4; Sigma-Aldrich, España). Previo a la realización de los ensayos con AgNPs, se llevó a cabo un estudio para determinar la mejor forma de preparar las disoluciones “stock” de AgNPs que había que adicionar a los tanques para tener la concentración nominal deseada en cada caso.

Estas disoluciones se prepararon en agua de mar y se estudió la eficacia de utilizar ultrasonido para preparar adecuadamente la suspensión a diferentes tiempos: 1, 30, 60, 180, 210 y 240 min, para una concentración de 15 mg AgNPs en 1 L de agua de mar.

Mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS: dynamic light scattering) (ver apartado 3.8) se determinó la distribución de las NPs a los diferentes tiempos. Se observó que después de 60 minutos no se producía una modificación en la distribución por tamaños, siendo el tamaño medio de las partículas presentes en la disolución filtrada tanto con un filtro de 0,45 μm como uno de 0,22 μm de 50-70 nm.

En base a esos estudios previos se planificó la forma de adicionar las AgNPs en los tanques de agua de mar para el primer día en el que se inició el ensayo y durante la renovación diaria del agua de los tanques, tanto para los bioensayos con larvas como sin ellas. Los procedimientos fueron los siguientes:

a) Preparación de los tanques el primer día del ensayo (0 horas)

Se preparó una disolución “stock” de plata coloidal de 15 mg L^{-1} en agua de mar (disolución A) según el procedimiento optimizado previamente. Es decir, después de pesar 15 mg de AgNPs y adicionarlos en un matraz de 1 L, se añadió agua de mar hasta enrase, y se sometió la suspensión a sonicación durante 1 hora en un baño de ultrasonido. Posteriormente y por dilución con agua de mar 1/100 de la disolución A, se obtuvo la disolución B de concentración 0,15 mg L^{-1} de plata coloidal. Con estas dos disoluciones “stock” se prepararon los tanques. La Figura 3.2 muestra de manera esquemática la adición requerida por cada tanque según la concentración nominal deseada (ver Tabla 3.1). En todos los casos se completó el volumen de cada tanque con agua de mar hasta tener un volumen final de 1,5 L.

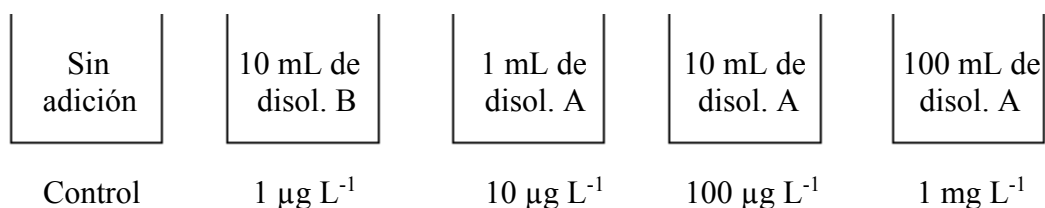


Figura 3.2. Preparación de los tanques a las 0 horas (disolución A: 15 mg L^{-1} AgNPs; disolución B: 0,15 mg L^{-1} AgNPs; volumen final: 1,5 L de agua de mar)

b) Reposición del agua de los tanques el 1^{er} día del ensayo

Con objeto de realizar el análisis del agua de los tanques una vez finalizada la preparación de los ensayos, se realizó la toma de muestra de agua mediante el sistema en continuo descrito en el apartado 3.2.1., tomando 250 mL de agua. La reposición de este

volumen se realizó mediante la adición de disolución A o B indicada en la Figura 3.3 y completando con agua de mar hasta tener de nuevo 1,5 L en cada tanque.

| | | | | |
|----------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|
| Sin adición | 4 mL de disol. B | 0,4 mL de disol. A | 4 mL de disol. A | 40 mL de disol. A |
| Control | 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ | 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ | 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ | 1 mg L^{-1} |

Figura 3.3. Reposición del agua de los tanques a las 0 horas (disolución A: 15 mg L^{-1} AgNPs; disolución B: 0,15 mg L^{-1} AgNPs; volumen final: 1,5 L de agua de mar)

c) Reposición de las aguas de los tanques desde el 2º hasta el 4º día

La renovación diaria del 50% del agua de los tanques se realizó mediante el sistema en continuo, tomando 750 mL de agua (el 50% del agua de cada tanque), y siguiendo el procedimiento de reposición ya seguido para el primer día, siendo los volúmenes de las disoluciones de AgNPs necesarios para ello los que se indican en la Figura 3.4, y completando hasta tener 1,5 L de agua de mar en cada tanque. El último día (96 h) se dio por finalizado el ensayo y no se realizó esta renovación del agua.

| | | | | |
|----------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------|
| Sin adición | 5 mL de disol. B | 0,5 mL de disol. A | 5 mL de disol. A | 50 mL de disol. A |
| Control | 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ | 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ | 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ | 1 mg L^{-1} |

Figura 3.4. Reposición del agua de los tanques a 24, 48 y 72 horas (disolución A: 15 mg L^{-1} AgNPs; disolución B: 0,15 mg L^{-1} AgNPs; volumen final: 1,5 L de agua de mar)

Del volumen de agua tomado diariamente de cada tanque de los experimentos sin larvas, se separaron 3 alícuotas de 25 mL cada una, de las cuales:

1. Una alícuota no se sometió a ningún procedimiento previo.
2. Otra fue doblemente filtrada mediante dos filtros de jeringa acoplados secuencialmente. El primer filtro tenía un tamaño de poro de 0,45 μm seguido por otro de 0,22 μm (Rephile Bioscience. Ltd, RephiQuik Syringe Filter, Boston, Massachusetts, USA).

3. La tercera alícuota fue primero filtrada según el procedimiento de la segunda alícuota y después centrifugada a 15000 rpm durante 8 minutos (ultracentrífuga refrigerada Biocen 22 R. Ortoalresa, España).

Después de estos pretratamientos, se evaluó el tamaño de las partículas en cada una de las alícuotas mediante DLS y espectroscopía UV-Visible (ver apartado 3.8), midiéndose la fase particulada y las NPs en la primera alícuota, las NPs en la segunda y debiendo estar todo disuelto en la tercera.

3.4. Preparación de las disoluciones de plata iónica (Ag^+)

El diseño de los ensayos se realizó incluyendo el estudio comparativo de la exposición a AgNPs y a plata iónica, en las mismas condiciones. Por ello, se prepararon los tanques con plata iónica de igual forma que la descrita en el apartado 3.3, utilizando dos disoluciones “stock” de Ag^+ en agua de mar, con concentraciones iguales que las de las disoluciones A y B. La disolución A de 15 mg L^{-1} de Ag^+ se preparó pesando 23,62 mg de AgNO_3 (para análisis, Panreac, España) que se disolvieron en 1 L de agua de mar. A partir de una dilución 1/100 de esta disolución realizada con agua de mar se obtuvo la disolución B de $0,15 \text{ mg L}^{-1}$ de Ag^+ .

3.5. Protocolos de limpieza

Cuando se analizan concentraciones traza de analito, a niveles de mg L^{-1} (ppm) o $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb), se requiere ser muy cuidadoso durante el proceso analítico, ya que es muy fácil la contaminación de las muestras. Para ello se emplean reactivos de elevada pureza y se debe trabajar con el material de laboratorio en condiciones de ultralimpieza. Atendiendo a estos requisitos en este trabajo se emplearon diversos protocolos de limpieza y condiciones de trabajo “limpias”.

El material usado (vasos de precipitados, pipetas, matraces, botes, embudos, etc.) se manipuló con guantes de plástico transparente y se sometió a una limpieza exhaustiva antes de los ensayos. Los botes de polietileno de baja densidad (código 203010, Eurotubo, Deltalab, Barcelona) empleados para almacenar las muestras de agua muestreadas durante los ensayos se lavaron según el siguiente procedimiento de ultralimpieza, y se

manipuló el material respetando el protocolo de “*manos sucias, manos limpias*” [Díaz de Alba, 2013]:

- 1) Primero se lavaron 5 veces con agua desionizada Milli-Q.
- 2) Luego se llenaron con una disolución de HCl 3 mol L⁻¹ (para análisis) y se taparon con su correspondiente tapón evitando que quedase aire en su interior.
- 3) Después se sumergieron en una disolución de HCl 0,1 mol L⁻¹ (para análisis) dentro de un bidón cuyas paredes interiores habían sido recubiertas previamente con bolsas opacas. Se cerraron las bolsas y se precintó el bidón para evitar la salida de ácidos dejándolo cerrado durante 6 semanas.
- 4) Pasado este tiempo, se vaciaron los botes y se enjuagaron 5 veces con agua desionizada Milli-Q.
- 5) Por último, se introdujeron en dobles bolsas de plástico con cierre hermético.
- 6) El día previo a su uso, se procedió al etiquetado de las bolsas.

El resto del material se limpió de la siguiente forma [Díaz de Alba, 2013]:

- 1) Un primer lavado con agua y jabón.
- 2) Enjuague 5 veces con agua desionizada Milli-RO por dentro y por fuera.
- 3) Enjuague 5 veces con HNO₃ 2 mol L⁻¹ (para análisis).
- 4) Por último, enjuague 5 veces con agua desionizada Milli-Q.

3.6. Toma de muestras

El primer día del ensayo (0 horas) se tomaron muestras de agua de todos los tanques y muestras de larvas del tanque general de la Planta de Cultivos Marinos, donde se encontraban las larvas a utilizar. El segundo día (24 horas) se tomaron muestras de agua y muestras de larvas del tanque 1 al 10 y una vez muestreados, se desmontaron. El tercer y cuarto día (48 y 72 horas) únicamente se controlaron los parámetros fisicoquímicos (de los tanques 11-20) mientras que el último día (96 horas) se tomaron muestras de larvas y agua de los tanques 11 al 20, dando por finalizado el test.

3.6.1. Muestras de agua

La toma de muestras de agua se llevó por succión con una bomba peristáltica (ver apartado 3.2.1). Se extrajeron 750 mL de agua de los tanques, correspondientes a la renovación del 50% del agua. De este volumen extraído se tomaron muestras para el análisis de plata y para medir el carbono orgánico disuelto (COD).

❖ Toma de muestra para el análisis del metal

- Los botes empleados para conservar la muestra de agua fueron de polietileno de 50 mL de capacidad. Se guardaron muestras tanto filtradas como sin filtrar. La filtración de estas muestras se realizó de manera secuencial a través de dos filtros de jeringa de poro 0,45 μm seguido por otro de 0,22 μm (Rephile Bioscience. Ltd, RephiQuik Syringe Filter, Boston, Massachusetts).
- Los botes una vez llenos se acidificaron con 0,1 mL de HNO_3 65% (calidad Suprapur, Merck, Alemania) para preservar el metal en disolución.
- Después se cerraron e introdujeron en dobles bolsas de plástico de cierres herméticos y se conservaron en un congelador a -20°C , hasta su posterior análisis.

❖ Toma de muestra para el análisis del COD

- Los botes utilizados para tomar la muestra fueron de vidrio ámbar de 50 mL de capacidad. Se llenaron al máximo para evitar que la presencia de aire en el interior pudiera alterar el resultado del análisis.

3.6.2. Muestras de larvas

Las larvas vivas fueron recogidas con ayuda de un colador y se lavaron con agua desionizada Milli-Q, agrupándose después en “pool” de 4-6 especímenes, en función del tamaño y número que quedasen en los tanques. Después, se introdujeron en tubos criogénicos que se sumergieron en nitrógeno líquido para conservarlas a -80°C para su posterior liofilización.

3.7. Tratamiento y análisis de las muestras de agua

3.7.1. Análisis de Ag^+ y AgNPs en las muestras de agua

El análisis del contenido de plata en las muestras de agua muestreadas, tanto con Ag^+ como con AgNPs, en los ensayos con y sin larvas, se realizó por espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). La exactitud de la metodología aplicada fue evaluada satisfactoriamente mediante el análisis de muestras de referencia de aguas de estuario: Ref-TMDA-64.2//Lote 0313//CRM Environment Canada//500 mL ($13 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ag^+) y Ref-TM-DWS.2//Lot Ni 0809//400 mL ($9,91 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ag^+).

Se emplearon dos rectas de calibrado con concentraciones diferentes debido a la disparidad de estos valores en los tanques. Una recta se empleó para ajustar las muestras con concentraciones bajas de metal de los tanques 1-3, 6-8, 11-13 y 16-18, y otra para las concentraciones más altas, es decir, las de los tanques 4-5, 9-10, 14-15 y 19-20.

El equipo de ICP-MS utilizado puede analizar muestras salinas, pero es recomendable que los valores de salinidad no sean muy superiores a $4\text{-}5 \text{ g L}^{-1}$. Por ello, las muestras fueron diluidas 1/10 y los patrones fueron preparados en una matriz con un contenido 1/10 en agua de mar/agua desionizada, siguiendo el siguiente procedimiento:

- 1) Se añadieron 2,5 mL de agua de mar (obtenida de las instalaciones de la Planta de Cultivos Marinos del CASEM) en matraces aforados de 25 mL de plástico.
- 2) Se acidificó la disolución con 50 μL de HNO_3 65% (calidad Suprapur, Merck, Alemania).
- 3) Luego se adicionó la correspondiente cantidad de plata según el patrón, y se enrasó con agua desionizada Milli-Q.

3.7.1.1. Preparación de las disoluciones patrón de las curvas de calibrado

Los patrones se prepararon a partir de un patrón comercial de 1000 mg L^{-1} de Ag (AgNO_3 en HNO_3 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) (calidad CertiPur, Merck KGaA, Alemania). Se preparó una primera disolución de concentración intermedia de 10 mg L^{-1} de Ag en agua Milli-Q, por dilución 1/100 del patrón comercial. A partir de ésta se obtuvo una segunda disolución de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ag en agua Milli-Q por dilución 1/10, y de ésta una tercera de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ag en agua Milli-Q por dilución 1/20. Estas disoluciones fueron utilizadas para la

preparación de los patrones de la curva de calibrado siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.7.1., cuyas concentraciones fueron:

- ❖ Curva de calibrado 1: 0; 0,1; 0,5; 1 y 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Ag en agua de mar/agua Milli-Q (relación 1/10).
- ❖ Curva de calibrado 2: 4; 6; 8; 10 y 12 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Ag en agua de mar/agua Milli-Q (relación 1/10).

3.7.1.2. Preparación de las muestras de agua para su análisis por ICP-MS

La dilución 1/10 de las muestras de agua de los tanques, requerida por la técnica ICP-MS (ver apartado 3.7.1.3), se realizó tomando 2,5 mL de muestra con una micropipeta que se depositaron en matraces de 25 mL. Luego se adicionaron 50 μL de HNO_3 65% (Suprapur, Merck, Alemania) y se enrasaron los matraces con agua Milli-Q. Éste fue el procedimiento que se siguió para todas las muestras de los distintos tanques, excepto las muestras de concentración nominal de 1 mg L^{-1} de Ag. En ese caso, es decir, para los tanques 5, 10, 15 y 20, se hicieron diluciones 1/100, tomando 0,25 mL de muestra y 2,25 mL de agua de mar sin metal (el agua de mar suministrada por la Planta de Cultivos fue analizada antes de su uso, no siendo detectable la presencia de plata), de modo que la relación agua de mar/agua Milli-Q fuese igual para todas las muestras y a su vez igual a la de los patrones. Se acidificaron con 50 μL de HNO_3 65% y enrasaron en matraces de 25 mL.

3.7.1.3. Condiciones de los análisis de agua de mar por ICP-MS

El análisis por espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) se realizó con un equipo X2 Series Thermo Elemental (Thermo, Reino Unido).

Para corregir la variación de la señal, se utilizó como patrón interno el elemento rodio (Rh^{103}), y Ag^{107} y el Ag^{109} como isótopos de referencia al ser los más abundantes en la naturaleza [Skoog y col., 2007]. Los parámetros instrumentales empleados fueron: potencia de radiofrecuencia aplicada de 1,4 kW, flujo del gas auxiliar de 0,80 L min^{-1} , flujo del nebulizador de 0,93 L min^{-1} , velocidad de introducción de la muestra de 20 rev min^{-1} [Quevedo y col., 2012].

La técnica ICP-MS permite la detección de elementos a niveles muy bajos (sub- $\mu\text{g L}^{-1}$), pero las interferencias espectrales y no espectrales causadas por los elementos de

matrices complejas, como la de agua de mar, limitan su uso directo. Las interferencias espectrales son causadas fundamentalmente por la presencia de especies poliatómicas que interfieren en las masas del analito, mientras que las interferencias no espectrales se deben a la influencia de elementos de matriz fácilmente ionizados en el plasma, así como a la acumulación de sales en los conos y lentes del equipo de ICP-MS. Por ello, se trabajó con antorcha PlasmaScreen (incrementa la señal) con inyector de zafiro, interfase XT (los conos de muestreo (“sampler”) y de separación (“skimmer”) son de níquel y tienen alta tolerancia a los sólidos disueltos totales), cámara ciclónica de PFA con nebulizador SeaSpray y celda de colisión/reacción hexapolar con helio, que elimina las interferencias poliatómicas. No obstante, se recomienda no analizar matrices con un contenido en TDS muy superior a 4-5 g L⁻¹. Por ello, las muestras de agua de mar fueron diluidas con agua desionizada Milli-Q en una relación 1/10. Esta proporción se empleó tanto en la preparación de las muestras de agua como en los patrones de las curvas de calibrado.

3.7.2. Análisis de carbono orgánico disuelto (COD) en las muestras de agua

El COD se determinó empleando un analizador de carbono (Analytic Jena 3100, Alemania). Antes de los análisis, las muestras de agua fueron filtradas con filtros de disco de nylon de 0,45 µm de poro (Millipore, Estados Unidos) y después fueron diluidas en una relación 1:10, añadiendo 2,5 mL de muestra de mar filtrada y enrasando con agua Milli-Q en matraces de 25 mL de polietileno de baja densidad. El equipo empleado utiliza el método de análisis diferencial, que calcula el contenido de COD mediante la diferencia entre el contenido de carbono total disuelto y el de carbono inorgánico disuelto.

3.8. Metodología para la caracterización de las NPs de plata en disolución

El comportamiento de las AgNPs en disolución de agua de mar se evaluó mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (dynamic light scattering, DLS) y el espectro de absorción molecular UV-Visible de las aguas de los tanques. La técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) analiza la variación en el tiempo de las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada por las partículas en suspensión bajo movimiento browniano y permite determinar la distribución de tamaños de partículas o macromoléculas en disolución [Berne y col., 2000]. Esta información se complementa

con la que suministra su espectro de absorción molecular. Los equipos utilizados para ello fueron el modelo DLS Nanotrak Wave II (Microtrac Inc, Estados Unidos) y el equipo de espectroscopía UV-Visible T80 UV/VIS Spectrophotometer (PG Instruments, Reino Unido).

3.9. Tratamiento y análisis de las muestras de larvas

3.9.1. Pretratamiento de las muestras

Las muestras de larvas conservadas a -80°C fueron deshidratadas por liofilización a una temperatura de $-85,7^{\circ}\text{C}$ y 0,021 milibares de presión durante 48 horas con un equipo Telstar LyoAlfa 10/15 (Telstar, Japón). Tras la liofilización las muestras fueron homogeneizadas en un mortero de ágata y sometidas a digestión ácida asistida con microondas (Milestone Srl. Ethos 1600, Advanced Microwave Digestion Labstation, Italia). Para la digestión ácida en microondas (Figura 3.5) se tomaron porciones de aproximadamente 0,25 g de peso de cada “pool” de larvas liofilizadas (anotado de forma exacta para los cálculos posteriores) a las que se añadió 4 mL de HNO_3 65% (calidad Suprapur, Merck, Alemania) y 2 mL de H_2O_2 30% (calidad Suprapur, Merck, Alemania).

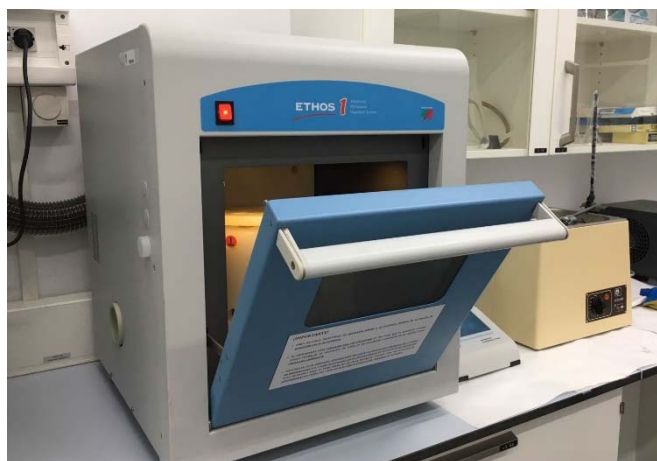


Figura 3.5. Digestor microondas utilizado para el pretratamiento de las muestras biológicas

El programa de calentamiento utilizado fue el siguiente: 4 minutos a 200 W de potencia, después 5 minutos a 400 W y por último 10 minutos a 600 W, tomándose una temperatura de 200°C como temperatura control durante todo el proceso [Díaz de Alba, 2013]. Una vez finalizada la digestión, las muestras se enfriaron y enrasaron hasta 25 mL

con agua desionizada (Milli-Q), siendo conservadas en recipientes de poliestireno hasta su análisis [Jia y col., 2017].

3.9.2. Análisis de plata en muestras de larvas

La determinación del contenido de plata en las muestras de tejido digerido de las larvas se realizó mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito (Figura 3.6) (Perkin Elmer Inc. AAnalyst 800, Estados Unidos). Esta técnica es muy adecuada para concentraciones de analitos a niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$ [Beaty y col., 1978].

Los análisis se realizaron empleando un modificador de matriz compuesto por 0,005 mg de Pd (Palladium matrix modifier for graphite furnace-AAS, $c(\text{Pd}) = 10,0 \pm 0,2 \text{ g L}^{-1}$ ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 ca. 15%), Merck, Alemania) y 0,003 mg de Mg (Magnesium matrix modifier for graphite furnace-AAS, $c(\text{Mg}) = 10,0 \pm 0,2 \text{ g/l}$ ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en HNO_3 ca. 17%), Merck, Alemania) para un volumen de muestra inyectado de 30 μL . De este modo, se consiguieron resultados mucho más precisos.

La exactitud de la metodología aplicada fue evaluada satisfactoriamente usando una muestra de referencia certificada DOLT-3 (hígado de cazón, *Squalus acanthias*).



Figura 3.6. Equipo de espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito utilizado en el análisis del contenido de metal en las larvas

4. Resultados

Como se ha indicado en el apartado de metodología, en este trabajo se han realizado bioensayos de toxicidad con larvas de dorada expuestas a plata iónica (Ag^+) y nanopartículas de plata (AgNPs). De forma complementaria y con objeto de conocer el comportamiento físico-químico de las AgNPs en el agua de mar, se han realizado estudios paralelos en ausencia de larvas a las dos concentraciones más altas de contaminante. Los resultados obtenidos de estos estudios se han recogido en las tablas del apartado de anexos y se discuten continuación.

4.1. Análisis de las aguas

4.1.1. Parámetros físico-químicos

Durante los experimentos se evaluaron *in situ* los parámetros físico-químicos siguientes: temperatura, pH, oxígeno disuelto, salinidad y concentración de sólidos totales disueltos (TDS), antes de la renovación diaria del agua. De esta forma se dispone de un control de las condiciones del medio en el que se realizan las experiencias para evitar que factores diferentes al contaminante afecten a los resultados de los bioensayos. Los resultados obtenidos se han recogido en las Tablas I, II, III, IV y V del apartado de anexos.

La **temperatura** es uno de los factores que afecta tanto a los procesos físicos, químicos y biológicos, influyendo por ejemplo en la densidad de agua, en la concentración de oxígeno disuelto y de otros gases importantes del medio acuático, en la solubilidad de muchas sales, en el pH, en el desarrollo y bienestar de la biota, etc. [Delgado, 2004]. Los valores de este parámetro obtenidos durante los ensayos se han representado en la Figura 4.1., pudiendo observarse que osciló entre 20,9 y 23,7 °C en los tanques sin larvas con AgNPs, y entre 23,4 y 26,0 °C en los experimentos con larvas expuestos tanto a Ag^+ como a AgNPs. Las diferencias entre estos valores medios de temperatura se debieron a que los experimentos sin larvas se realizaron en una semana distinta a los experimentos con larvas, variando ligeramente la temperatura ambiente esos días. Se observó que para todos los casos se produjo una disminución de la temperatura con el tiempo a lo largo de la semana, también resultado de las condiciones de temperatura ambiente. No obstante, estas variaciones no fueron significativas.

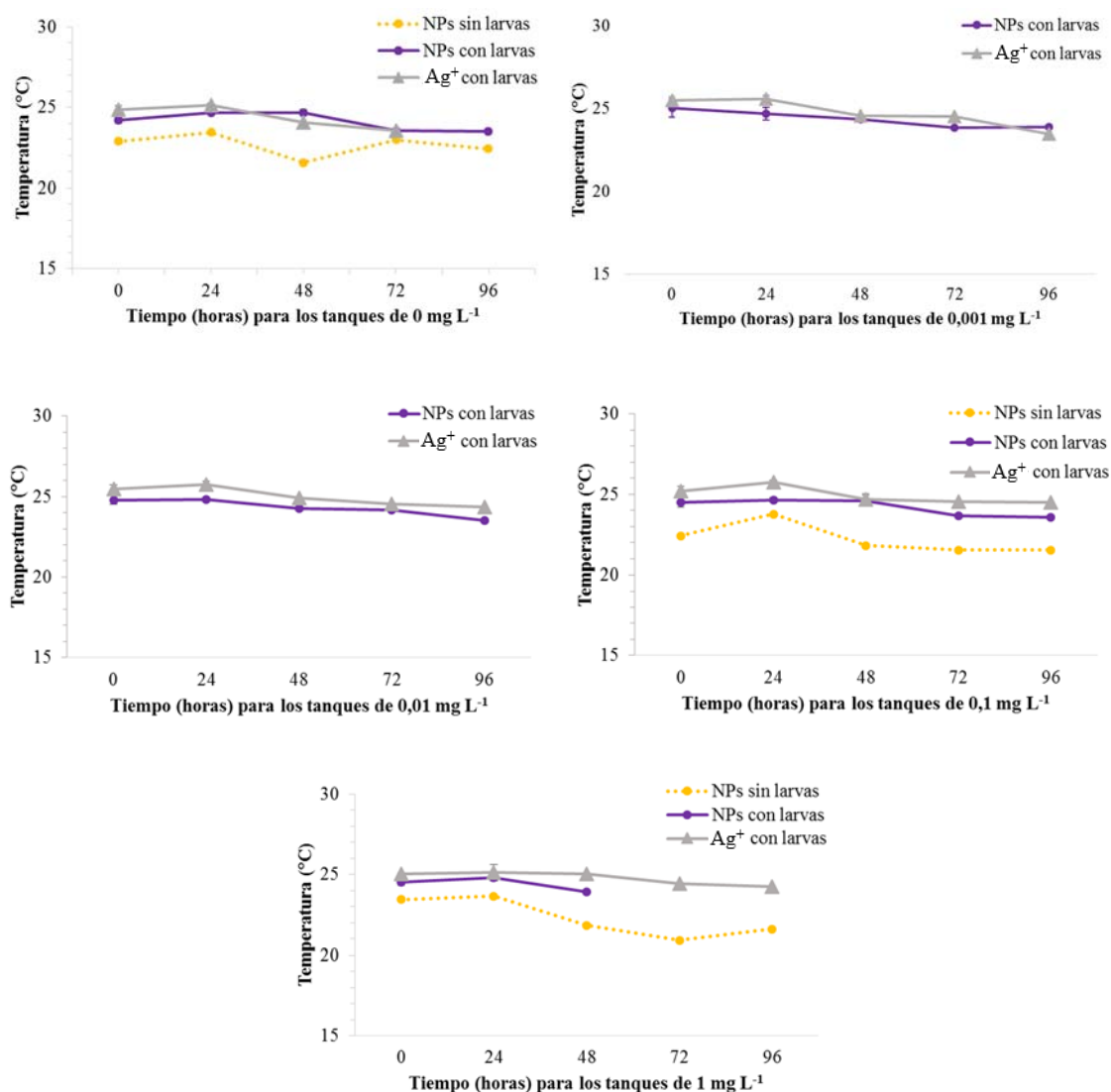


Figura 4.1. Variación de la temperatura durante los ensayos (con y sin larvas) para las distintas concentraciones de Ag⁺ y AgNPs

En cuanto a los valores de **pH**, hay que señalar que se consideran valores de pH compatibles con la vida acuática a aquellos comprendidos entre 5 y 9 [Rodier, 2011], siendo el intervalo usual para el agua de mar entre 6,5 y 8,3. Valores por encima de 11 o inferiores a 4 se consideran muy tóxicos para la vida [Coto, 2015; Sandoval, 2007].

Durante los ensayos de este trabajo, los valores registrados permanecieron dentro del rango adecuado para la vida como puede observarse en la Figura 4.2. Estos valores de pH oscilaron entre 7,3 y 8,2 para los tanques con larvas en presencia de Ag⁺ y entre 7,8 y 8,2 para las aguas con AgNPs, aumentando levemente en los primeros días y disminuyendo al final del experimento, a excepción de los valores para una concentración de 1 mg L⁻¹ de Ag⁺, con un valor de pH que se recupera el cuarto día.

Los valores del pH del agua en los tanques sin larvas estuvieron dentro del rango usual del agua de mar, aunque fueron ligeramente más altos a los obtenidos en los bioensayos. En la Figura 4.2 se observa como variaron entre pH 7,8 y 8,5 y como mostraron variaciones poco significativas entre los días.

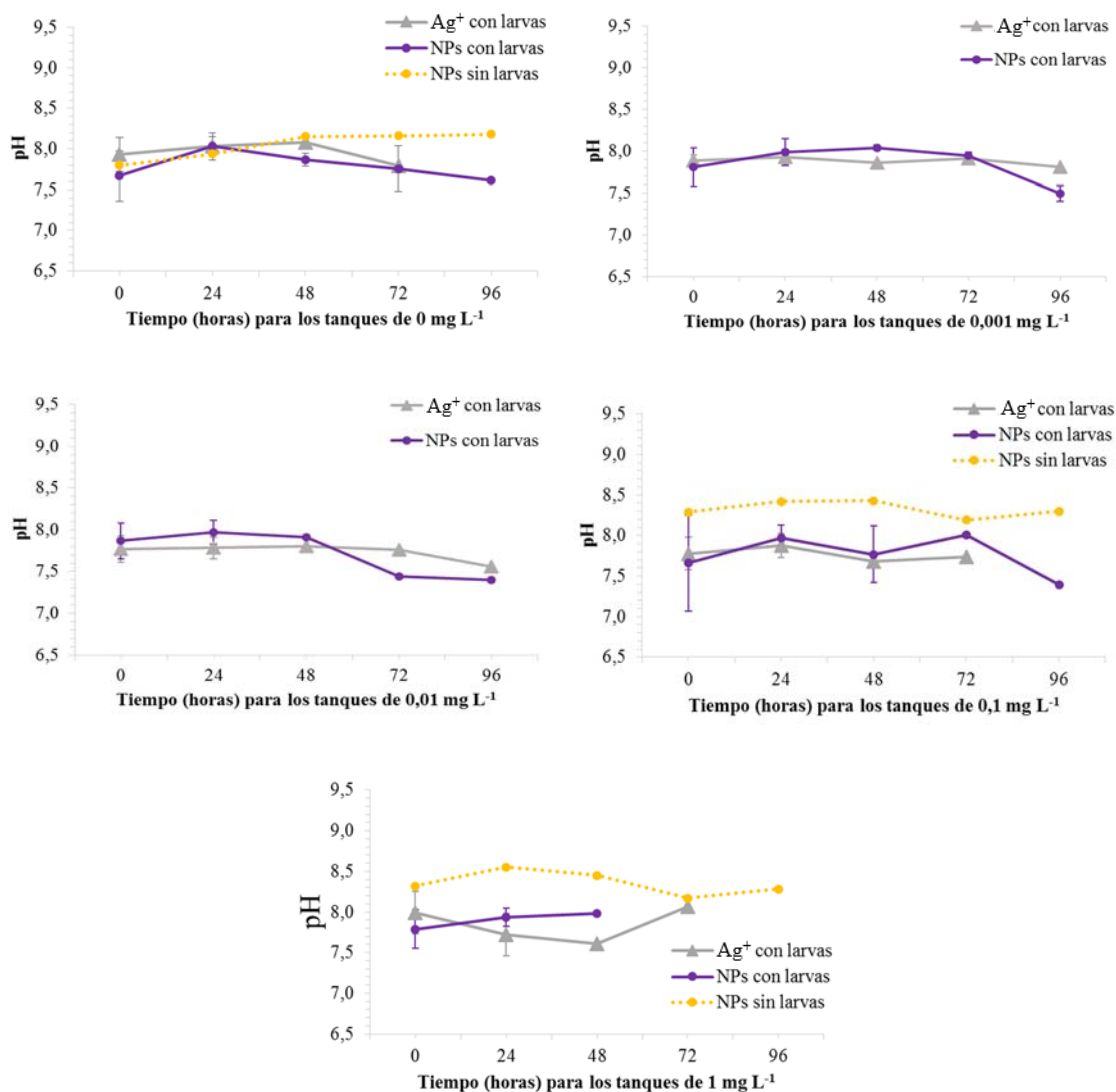


Figura 4.2. Variación del pH durante los ensayos (con y sin larvas) para las distintas concentraciones de Ag^+ y AgNPs

El **oxígeno disuelto** es otro parámetro importante en el control de las aguas de los tanques. En las aguas naturales es indispensable para la respiración de los organismos, causa la degradación de la materia orgánica (o putrefacción) y permite que se produzcan los ciclos biogeoquímicos. Su solubilidad en agua depende de la temperatura, de la presión atmosférica y de la salinidad. Se recomienda que la concentración de oxígeno

disuelto no sea inferior a 5 mg L^{-1} , ya que afectaría al nivel de actividad, alimentación, crecimiento y reproducción de los organismos vivos, además de favorecer la aparición de enfermedades [Coto, 2015; Sandoval, 2007]. De ahí la importancia del control de la aireación de los tanques a través de difusores.

Los resultados obtenidos para este parámetro se recogen en la Figura 4.3. En los experimentos sin larvas el oxígeno disuelto se mantuvo más estable con el tiempo, sin sufrir cambios bruscos, estando en un rango entre $6,2$ y $7,1 \text{ mg L}^{-1}$.

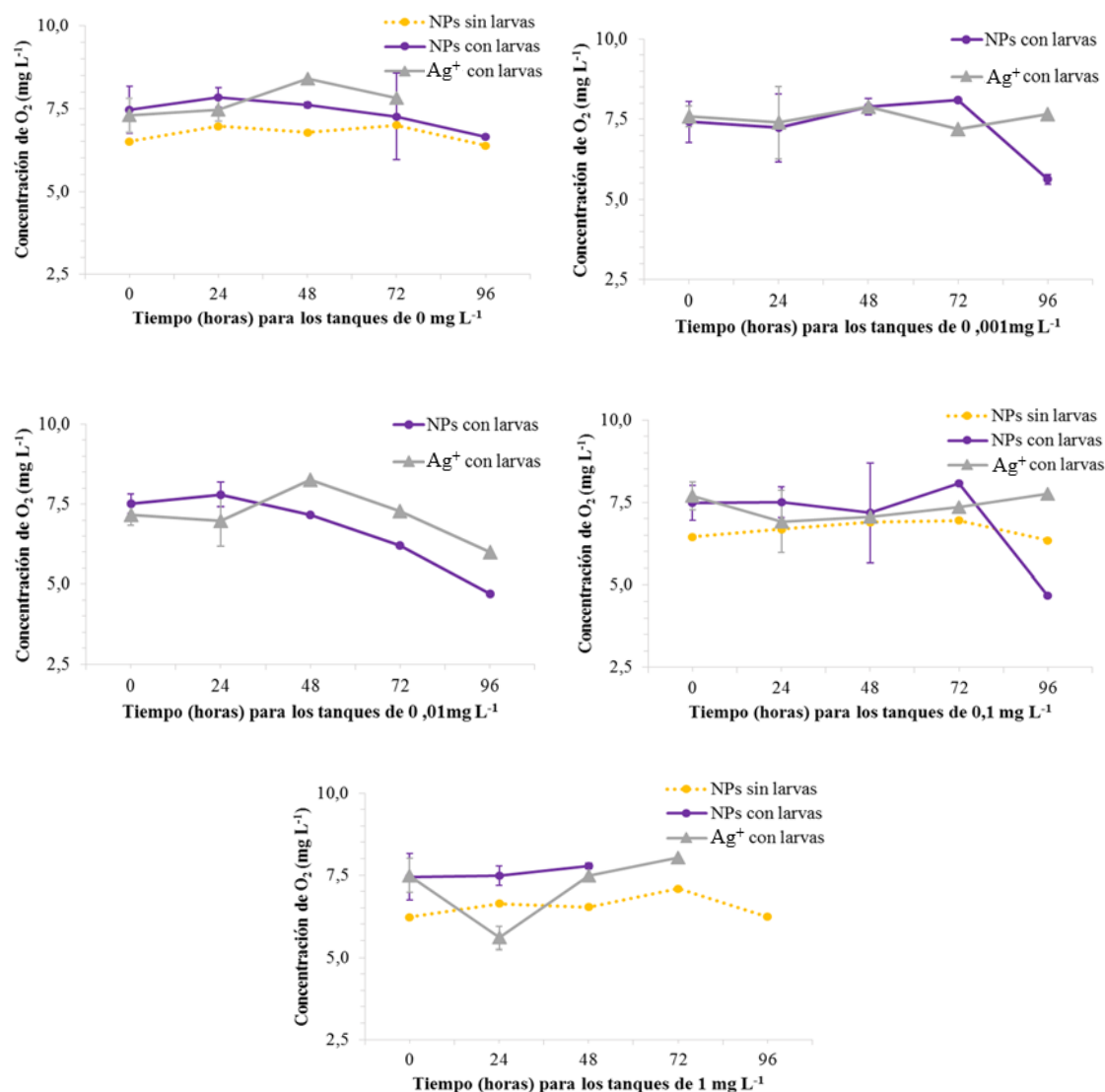


Figura 4.3. Variación del oxígeno disuelto durante los ensayos (con y sin larvas) para las distintas concentraciones de Ag^+ y AgNPs

En los experimentos con larvas, la tendencia general del oxígeno fue un descenso progresivo según transcurría el experimento, con una pequeña caída a partir del tercer día. Así, en presencia de Ag^+ y AgNPs los valores de este parámetro estuvieron entre 5,6 y 8,4 mg L^{-1} . Algunas de las oscilaciones de este parámetro pudieron deberse a caídas de presión en los aireadores, al tener muchos tanques instalados así como a las pequeñas variaciones de temperatura entre días. Puede verse como para 1000 mg L^{-1} de Ag^+ , y transcurridas 24 h en los tanques con larvas, el oxígeno disminuyó hasta 5,6 mg L^{-1} . Como excepción hay que destacar que el último día del ensayo, en los tanques con concentraciones de 10 y 100 mg L^{-1} de AgNPs, disminuyó el oxígeno disuelto ligeramente por debajo del valor adecuado hasta 4,7 mg L^{-1} en ambos casos, aunque esto ocurrió cuando se dio por concluido el estudio.

La **salinidad** y los **sólidos totales disueltos** (TDS) son parámetros que están relacionados. La salinidad es considerada como la cantidad de sales en disolución. Ésta afecta a determinados parámetros físicos como la densidad, la tensión superficial o la solubilidad de los gases [Delgado, 2004; Sandoval, 2007]. Los sólidos totales disueltos son una medida de las sustancias orgánicas e inorgánicas, tanto en forma molecular, así como ionizada o micro-granular, que contiene el agua. Para que las sales puedan considerarse como TDS, las sustancias deben de ser lo suficientemente pequeñas y los sólidos tienen que ser capaces de pasar por un filtro de 2 μm [Sandoval, 2007; Orozco-Barrenetxea, 2008].

La variación de la salinidad durante los ensayos se recoge en la Figura 4.4, correspondiendo a valores propios del agua de mar, con incrementos pequeños con el tiempo debidos probablemente a la evaporación de los tanques durante los ensayos, siendo este efecto mayor el último día. También se aprecian valores ligeramente inferiores si se comparan los datos de los ensayos sin larvas de los que se hicieron con anterioridad con ellas, aunque la tendencia es similar a lo largo de la semana que dura el estudio. El rango de salinidad para los ensayos con larvas presentó un rango entre 29,5 y 41,1 g L^{-1} , siendo de 26,73 y 32,29 g L^{-1} para los ensayos sin larvas. Estos rangos, expresados como STD y proporcionados igualmente por la sonda multiparamétrica, fueron respectivamente: 22,8-30,6 g L^{-1} (ensayos con larvas) y 20,8-24,6 g L^{-1} (ensayos sin larvas).

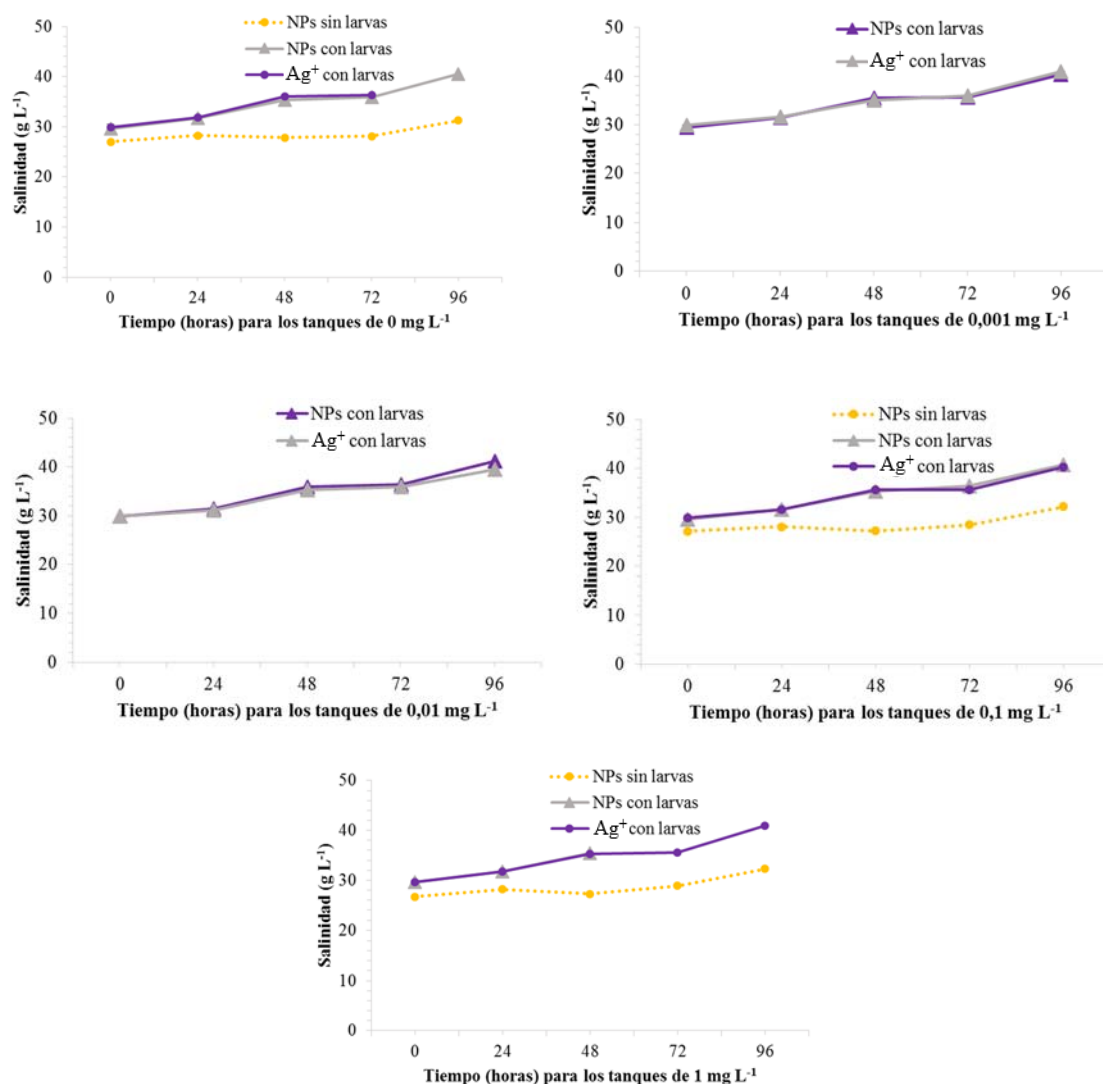


Figura 4.4. Variación de la salinidad durante los ensayos (con y sin larvas) para las distintas concentraciones de Ag⁺ y AgNPs

4.1.2. Carbono Orgánico Disuelto (COD)

La materia orgánica disuelta en las aguas (expresada como tal o como carbono orgánico disuelto (COD)) tiene diversas fuentes, destacando la liberación desde las algas durante la fotosíntesis, la autólisis y lixiviación de compuestos solubles a partir del material vegetal y de los animales muertos, o las pérdidas que ocurren durante la alimentación de los animales y por excreción de los mismos. Su presencia se relaciona con una posible disminución del oxígeno disuelto que se consume en su degradación, lo que puede derivar en una disminución de la calidad del agua. De este modo valores bajos de oxígeno disuelto se podrían dar en aguas contaminadas por materia orgánica, como las

aguas sépticas o estancadas, siendo por tanto incapaces para albergar determinadas formas de vida. En agua de estuario se consideran valores normales para este parámetro entre 1 a 5 mg L⁻¹ [Díaz de Alba, 2013].

Para realizar el control de este parámetro durante los ensayos, se analizó el COD al mismo tiempo que se realizó la toma y análisis de muestras de larvas, es decir, a las 0, 24 y 96 horas. Los resultados se detallan en las Tablas VI y VII del apartado de anexos. La Figura 4.5 muestra su evolución a lo largo del tiempo para los diferentes experimentos junto con la desviación estándar. Este parámetro se midió a las 0 horas (primer día) solo en las aguas de los tanques 1 y 6, es decir, los de concentración de plata 0 mg L⁻¹, correspondiendo al contenido de COD del agua de mar utilizada. Se consideró este valor válido para todos los ensayos a las 0 horas ya que el resto de los tanques solo se diferencian con éstos en la adición de metal.

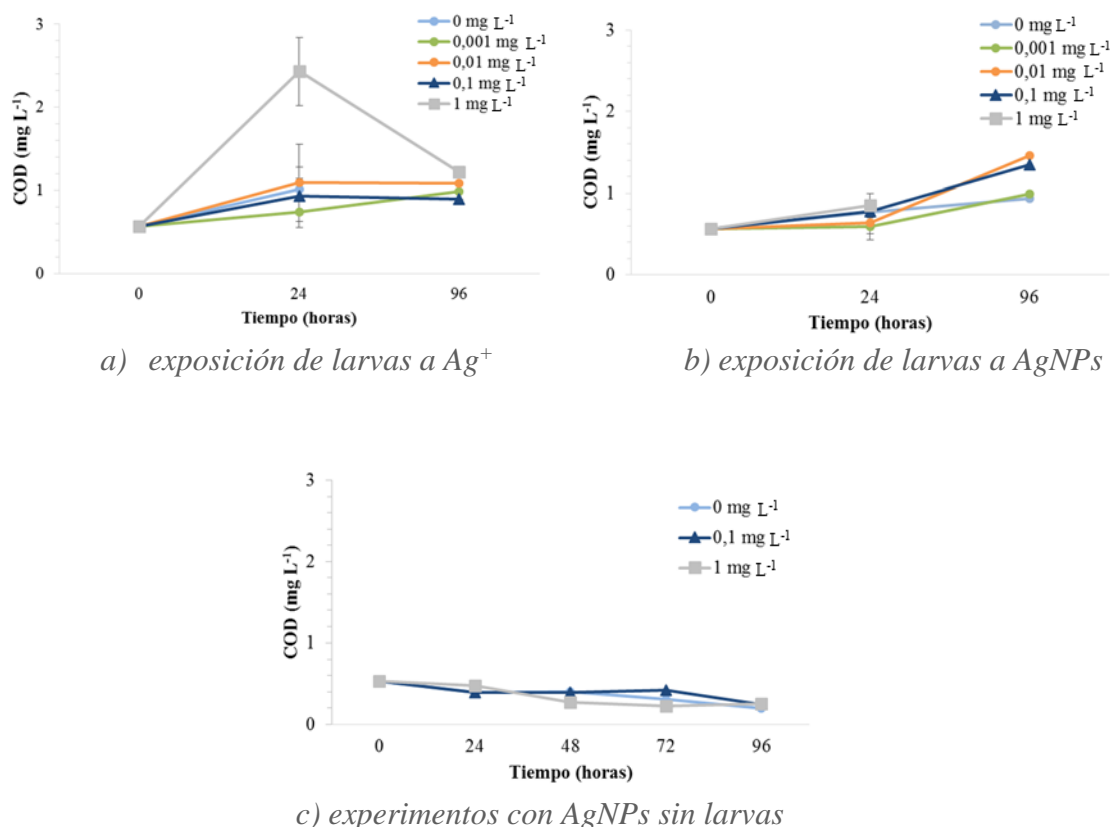


Figura 4.5. Variación del COD durante los ensayos (con y sin larvas) para las distintas concentraciones de Ag⁺ y AgNPs

De los resultados obtenidos se puede observar como a lo largo de la semana del ensayo, el contenido de carbono orgánico disuelto fue aumentando ligeramente en los tanques con larvas para ambas formas de plata, no dependiendo de forma significativa de la concentración de metal sino del tiempo transcurrido. Así, parece lógico que la presencia de larvas (adición de alimento, excreción...) en los tanques incremente este parámetro, aunque la renovación diaria de las aguas evita que sean incrementos mayores. De hecho, en los tanques sin larvas este parámetro no solo no crece, sino que disminuye con el tiempo, pudiendo ser debido a su degradación.

Para los bioensayos con plata iónica los valores de COD variaron entre 0,6-1,2 mg L⁻¹ (Figura 4.5.a), con la excepción de un valor ligeramente más alto de 2,4 mg L⁻¹ en los tanques de máxima concentración de metal a las 24 horas. Este hecho coincidió también con una bajada del oxígeno disuelto hasta 5,6 mg L⁻¹, que fue indicada anteriormente, lo que se puede explicar conjuntamente al consumirse oxígeno cuando hay más carga orgánica. En los ensayos con exposición a nanopartículas de plata el COD varió entre 0,6 y 1,4 mg L⁻¹ (Figura 4.5.b). Por último, y como se ha indicado, los valores de COD en los experimentos con AgNPs sin larvas fueron menores, variando entre 0,2 y 0,5 mg L⁻¹ (Figura 4.5.c)

Se puede concluir, por tanto, que el parámetro del carbono orgánico disuelto varió en función de la presencia o no de larvas en los ensayos, aunque los valores medidos siempre estuvieron por debajo de los valores usuales en agua de mar, no debiendo afectar la materia orgánica a la viabilidad de las larvas en los bioensayos.

4.1.3. Concentración de Ag⁺ y AgNPs en las muestras de agua de los ensayos

Los ejemplares de larvas de dorada se expusieron a distintas concentraciones nominales de Ag⁺ y AgNPs: 0; 0,001; 0,01; 0,1; 1 mg L⁻¹. El análisis del contenido de plata en las muestras de agua de estos experimentos se realizó por espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). De igual forma se analizaron las muestras de agua con AgNPs para el estudio de su evolución en agua de mar sin larvas. Los resultados se detallan en las Tablas VIII, IX, X, XI y XII del apartado de anexos.

En las Figuras 4.6 y 4.7 se puede observar la evolución del metal en las aguas a lo largo del tiempo en los experimentos realizados con larvas. Para ello se ha representado el logaritmo de la concentración real de plata medida en el eje de ordenadas frente al logaritmo de la concentración nominal de metal en el eje de abscisas. No se ha incluido la correlación de estos valores para los tanques control, dado que el logaritmo de la concentración nominal de 0 mg L⁻¹ no puede utilizarse. Por ello, se ha indicado el contenido medido de plata en el agua de mar utilizada para los ensayos antes de la adición, representado en el eje Y con el siguiente símbolo (●), para tener una referencia de este dato basal.

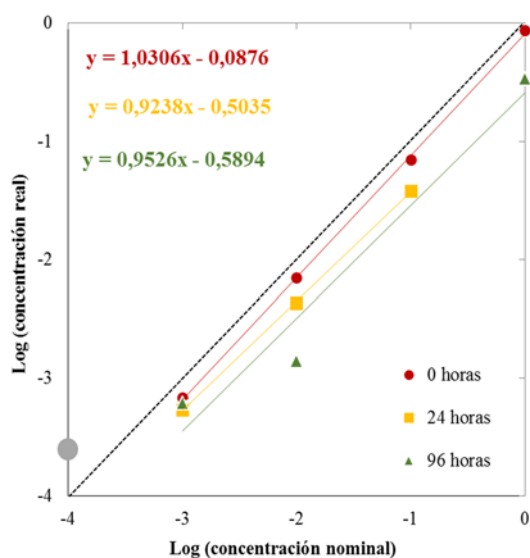


Figura 4.6. Variación del logaritmo de la concentración de Ag medida en las aguas frente a la concentración nominal para la exposición de larvas a Ag⁺

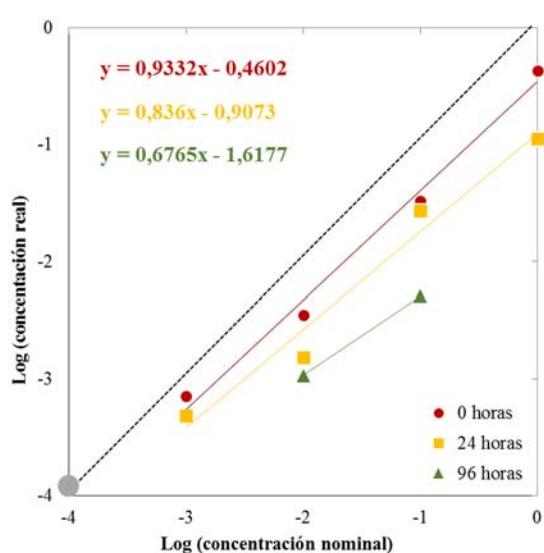


Figura 4.7. Variación del logaritmo de la concentración de Ag medida en las aguas frente a la concentración nominal para la exposición de larvas a AgNPs

La Figura 4.6 corresponde a los tanques con adición de Ag⁺, mientras que la Figura 4.7 representa aquellos tanques con AgNPs. Si el metal adicionado permanece en disolución la recta representada deberá de coincidir con la línea diagonal de la gráfica. Además, cuando el incremento en la concentración nominal coincida con el incremento en la concentración medida, la pendiente que se obtenga será 1. En caso de que la concentración adicionada evolucione en el medio por precipitación, por agregación..., los resultados se alejarán de estos valores. Este efecto es mayor en los experimentos con AgNPs que con plata iónica. Así, se observa cómo la concentración de Ag medida en los

experimentos con Ag^+ se ajusta más a los valores nominales que cuando se adicionan AgNPs; además, con el tiempo, cada vez este efecto es mayor, disminuyendo la pendiente de las rectas (Figura 4.7), siendo las concentraciones medidas en el agua mucho menores que las concentraciones nominales.

De igual forma se han representado los resultados de los experimentos realizados para evaluar la evolución de las AgNPs en agua de mar, sin la presencia de larvas, en las Figuras 4.8, 4.9 y 4.10. En este caso, el valor de la concentración de plata se ha medido en las muestras de aguas sin pretratar, filtradas, y filtradas y centrifugadas, respectivamente. A partir de estas figuras se puede indicar que:

- ❖ Las muestras de agua sin pretratar (Figura 4.8) presentan una concentración de Ag menor que la nominal, estando las rectas representadas en esta figura por debajo de la recta esperada (diagonal), donde la concentración nominal y medida coinciden. Este efecto es más destacado al aumentar el tiempo transcurrido desde el inicio del ensayo. Este efecto ya se produce desde el comienzo del ensayo, para las muestras de agua en los tanques el primer día (0 h) y se incrementa los siguientes días. Este efecto se puede evaluar a partir de los valores en la ordenada en el origen, que vale 0 para la recta diagonal y disminuye hasta -0,3491 para 0 h, -0,6135 para 24 h, -0,9292 para 48 h, -0,9027 para 72 h y -0,7508 para 96 h. A partir del tercer día los valores son más semejantes. Por otro lado, la pendiente de estas rectas se utiliza para evaluar si el incremento en la concentración nominal se produce en igual medida que en la concentración analizada. De los resultados de las ecuaciones de las rectas puede observarse que la mayoría de las pendientes son similares a la de la recta diagonal, es decir, próximas a 1. No obstante, para los resultados obtenidos a las 24 horas proporcionan una pendiente de 1,3788 lo que indica que la disminución en la concentración de plata medida respecto de la concentración nominal tiene menos efecto para la concentración más elevada (1 mg L^{-1}).
- ❖ En el caso de las muestras filtradas (Figura 4.9) el descenso en la concentración medida se produce el primer día y es igual para los siguientes. La ordenada en el origen desciende incluso más el primer día, y luego oscila entre -0,7655 y -0,9259.
- ❖ Si las muestras de agua son filtradas y también centrifugadas (Figura 4.10) ocurre algo similar.

Estos resultados sugieren que las AgNPS evolucionan en el medio entre el primer y segundo día, con una disminución aproximada del 90% de la plata en el medio, y permaneciendo en forma de plata iónica, pues las muestras filtradas y centrifugadas presentan igual evolución que las muestras filtradas. Si hubiera AgNPs, éstas deben permanecer en la muestra filtrada pero no en la muestra filtrada y centrifugada.

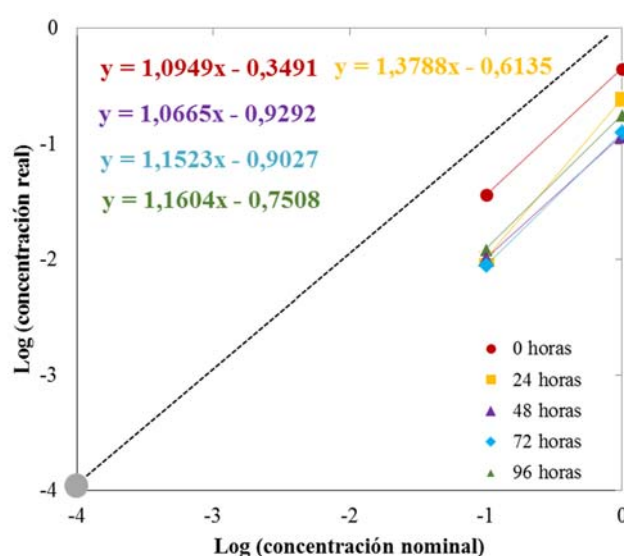


Figura 4.8. Variación del logaritmo de la concentración de Ag medida en las aguas sin pretratar frente a la concentración nominal para los experimentos con AgNPs sin larvas

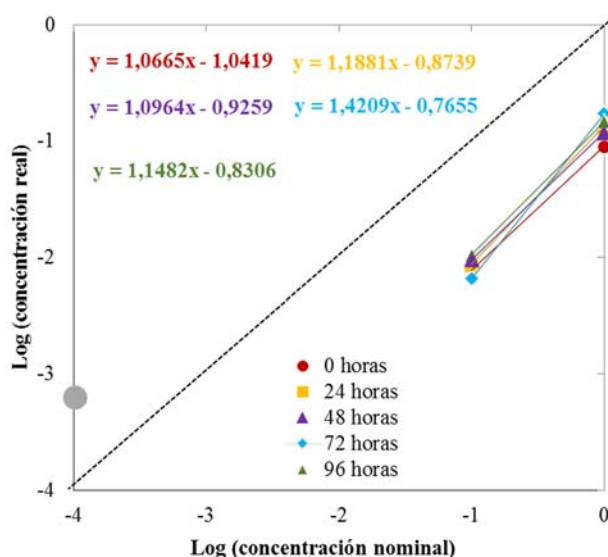


Figura 4.9. Variación del logaritmo de la concentración de Ag medida en las aguas filtradas frente a la concentración nominal para los experimentos con AgNPs sin larvas

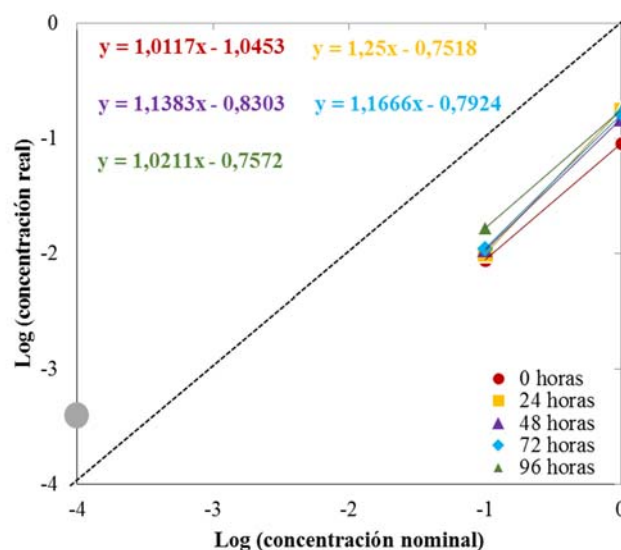


Figura 4.10. Variación del logaritmo de la concentración de Ag medida en las aguas filtradas y centrifugadas frente a la concentración nominal para los experimentos con AgNPs sin larvas

4.1.4. Caracterización mediante UV-Visible y DLS de las AgNPs en el ensayo sin larvas

El comportamiento de las AgNPs en disolución de agua de mar se evaluó también a través de su caracterización en disolución para la concentración más alta estudiada, empleando los espectros de absorción molecular UV-Visible de las aguas de los tanques y evaluando la distribución del tamaño de partículas obtenido por dispersión dinámica de la luz (DLS). En la Figura 4.11 se puede observar, para la muestra de agua de mar empleada antes de la adición de AgNPs, el espectro UV-Visible y la distribución por tamaño de las partículas. No se observa ningún máximo de absorción característico y el tamaño de las partículas es del orden de 1 nm dado que aún no se han adicionado NPs. Este valor de tamaño es tan pequeño que puede considerarse ruido de la señal del equipo (<1 nm: ruido).

De forma similar, en la Figura 4.12 se han registrado los espectros UV-visible correspondientes a las muestras de agua de mar con 1 mg L⁻¹ de AgNPs sin pretratamiento

previo, filtradas y centrifugadas (ver apartado 3.3). En esta figura puede observarse claramente la banda típica de resonancia del plasmón de la superficie de las NPs a aproximadamente 400 nm [Cruz y col., 2012], para las muestras al comienzo de los experimentos, es decir, a las 0 horas. La comparación de este espectro con el de la Figura 4.11 evidencia la presencia de nanopartículas en la suspensión al comienzo de la experiencia, una vez se ha realizado la adición de AgNPs. Por otro lado, cuando la muestra de agua se filtra o se centrifuga, la mayoría de las nanopartículas se eliminan. Esto se puede comprobar mediante la observación en la caída de absorbancia en todo el espectro.

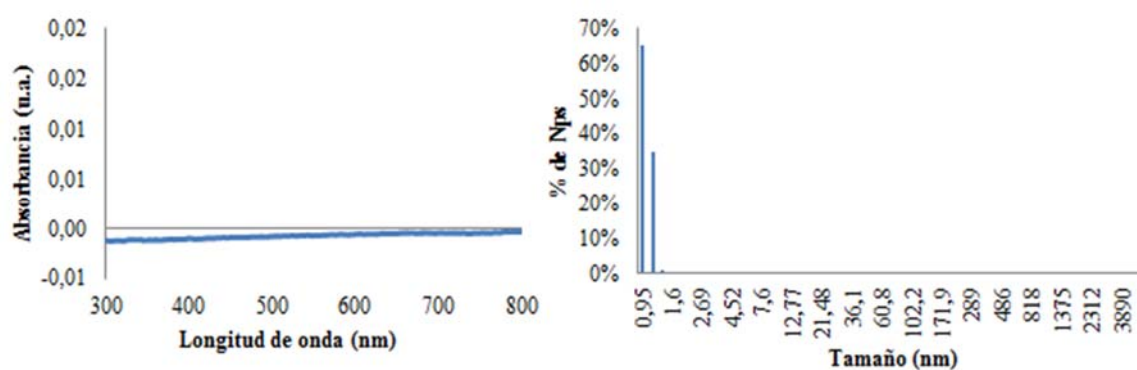


Figura 4.11. Espectro UV-visible y distribución de partículas (DLS) del agua de mar empleada en los experimentos sin larvas antes de la adición de AgNPs

Después de 24 y 96 horas, la mayor parte de AgNPs precipitan, ya que no se obtienen resonancias plasmónicas superficiales. Las mayores absorbancias se obtienen para las muestras de agua con nanopartículas sin pretratar, pero incluso en ese caso los valores son muy bajos. Esto parece indicar que, durante los días en los que se realiza el estudio, las nanopartículas evolucionan en gran medida aglomerándose y, posteriormente, precipitando. Así, no se aprecian diferencias claras entre los espectros de las aguas con nanopartículas después de 24 y de 96 horas.

Mediante la caracterización de la distribución de tamaños de las partículas en las muestras de agua con adición de 1 mg L^{-1} de AgNPs se observaron los siguientes resultados:

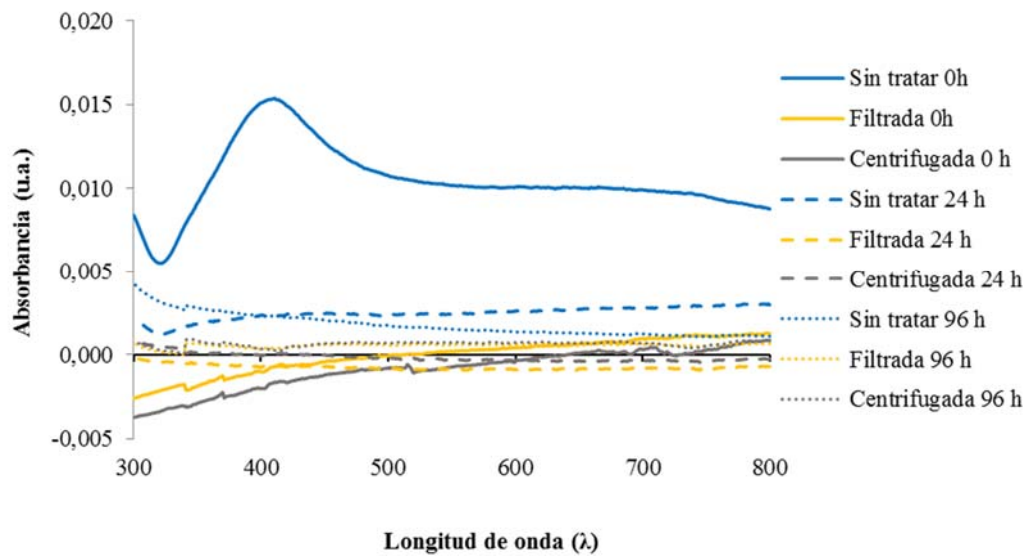


Figura 4.12. Espectros de UV-Visible de las aguas de los tanques de los experimentos sin larvas con adición de 1 mg L^{-1} de AgNPs

- ❖ En la muestra de agua sin pretratar de los tanques a las 0 horas (Figura 4.13) se puede apreciar un tamaño promedio ponderado de las partículas de 237,21 nm, con un alto valor de desviación estándar debido a la presencia de una distribución bimodal para el tamaño de las partículas: una centrada a aproximadamente en 100 nm y la segunda a aproximadamente a 450 nm, indicativo de que desde que se prepara el tanque, se toma la muestra y se procede a las medidas por DLS ya ha comenzado la aglomeración. Una vez que las muestras de agua a las 0 horas han sido filtradas y centrifugadas la distribución es parecida a la que presenta el agua de mar sin NPs.
- ❖ Tras 24 horas (Figura 4.14) los resultados obtenidos son muy semejantes a los obtenidos con los procesos de filtración y centrifugación aplicados a la muestra de 0 horas. Esto indica que no hay indicios de nanopartículas y que las señales obtenidas se deben atribuir nuevamente a ruido del aparato. Por tanto, es posible afirmar que las nanopartículas se han aglomerado y precipitado como se indicó en el espectro UV-Visible.
- ❖ Los resultados para las muestras de 96 horas (Figuras 4.15) son muy similares a los obtenidos a las 24 horas, lo que indica que se mantiene el hecho de que las nanopartículas siguen precipitadas.

De todo ello cabría indicar que, dado que estos análisis se hacen antes de la renovación diaria de las aguas de los tanques, dicha renovación, que tiene adicionadas las AgNPs en suspensión, se hace necesaria si se quiere mantener cierto tiempo las NPs sin agregar, aunque se ha comprobado que este proceso se inicia bastante pronto.

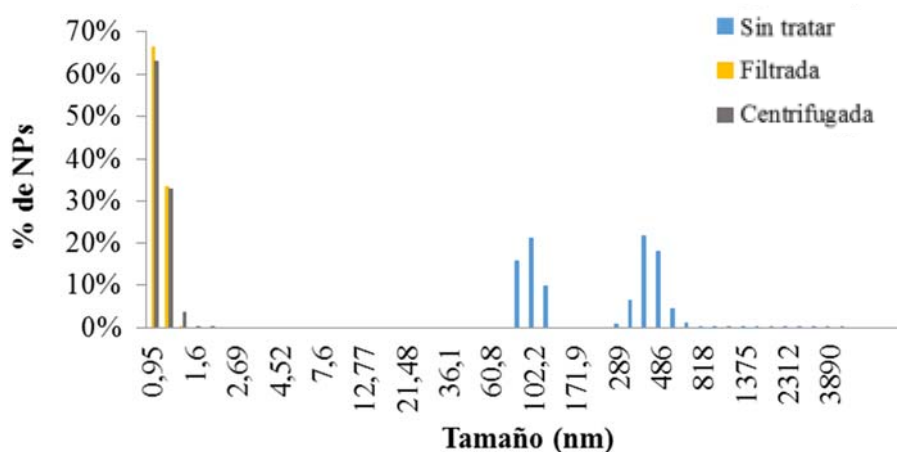


Figura 4.13. Distribución de partículas (DLS) del agua de los experimentos sin larvas con 1 mg L^{-1} de AgNPs a las 0 horas

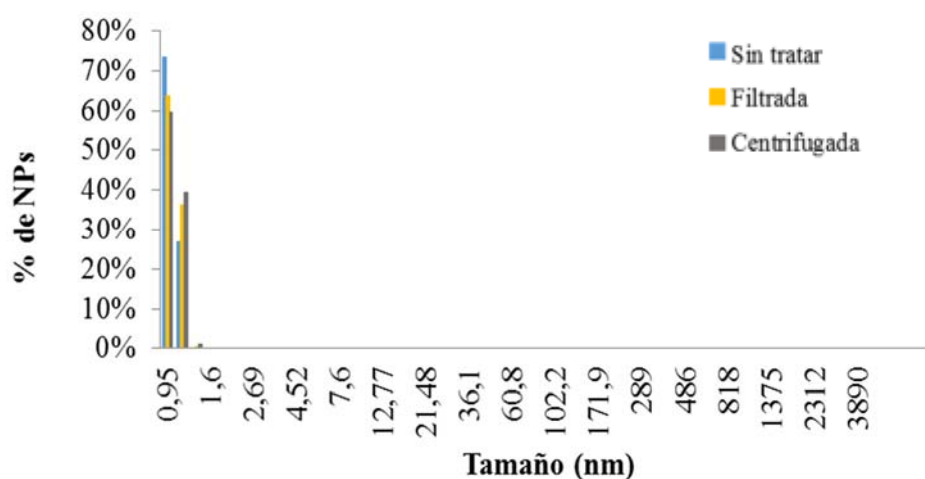


Figura 4.14. Distribución de partículas (DLS) del agua de los experimentos sin larvas con 1 mg L^{-1} de AgNPs a las 24 horas

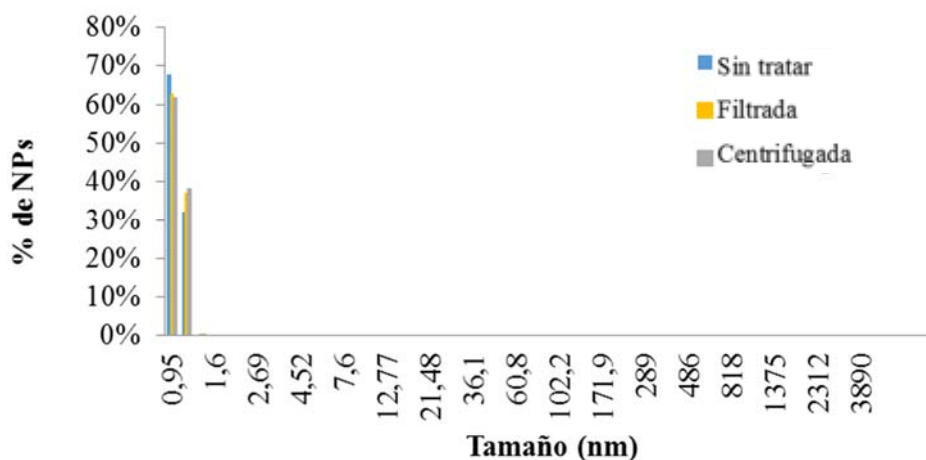


Figura 4.15. Distribución de partículas (DLS) del agua de los experimentos sin larvas con 1 mg L^{-1} de AgNPs a las 96 horas

4.2. Análisis del contenido de plata en las larvas de dorada

El contenido de plata en las muestras de larvas de los bioensayos fue analizado por espectroscopía de absorción atómica (AAS), por lo que el metal acumulado se cuantifica como elemento, sin diferenciar la forma en la que se ha acumulado. Por ello, los resultados que se obtienen se expresan como mg de Ag por kg de muestra, tanto para los ensayos con Ag^+ como para los que se realizaron con adición de AgNPs. En ambos casos, estos resultados permiten evaluar si la exposición al contaminante se acumula en las larvas y comparar si esta acumulación depende de la forma química en la que está presente en el agua.

En las Figuras 4.16 y 4.17 se ha representado la concentración nominal de plata presente en las aguas en el eje de abscisas frente a la concentración real encontrada en las larvas en el eje de ordenadas, tanto a las 24 como a las 96 horas. Las concentraciones se han representado con la desviación estándar del análisis para cada tanque y su réplica. Se observa que existe un claro aumento de la concentración metálica en las larvas al aumentar el tiempo de exposición para la mayoría de las concentraciones adicionadas. Por otro lado, las larvas expuestas a plata iónica bioacumulan mucho más metal que

aquellas que fueron expuestas a AgNPs. También se observa que la mortalidad en presencia de nanopartículas se produce más tarde que con plata iónica.

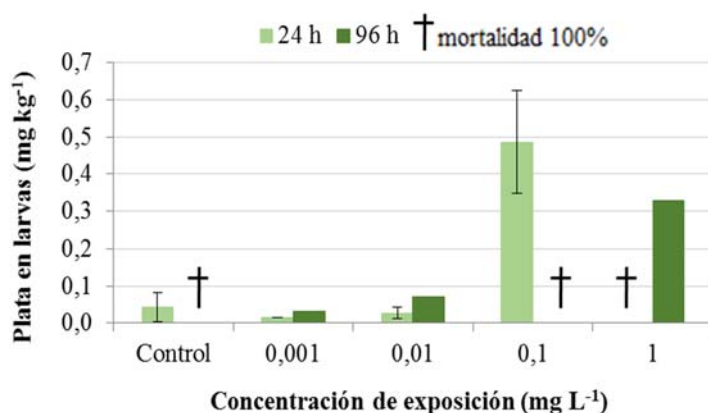


Figura 4.16. Concentración de Ag (mg kg^{-1}) en las larvas de dorada expuestas 24 y 96 horas a concentraciones nominales de Ag^+ (plata iónica) en agua

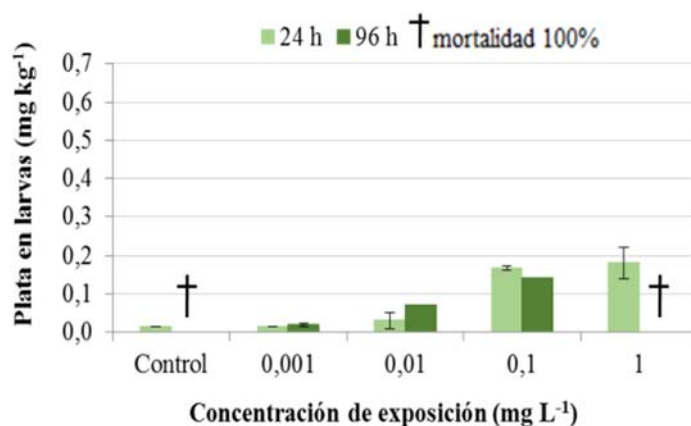


Figura 4.17. Concentración de Ag (mg kg^{-1}) en las larvas de dorada expuestas 24 y 96 horas a concentraciones nominales de AgNPs en agua

En cuanto al efecto sobre las larvas por la exposición a Ag^+ (Figura 4.16) se observa que conforme va aumentando el tiempo de exposición y la concentración, se alcanza una mortalidad total de las larvas. En cambio, en presencia de plata como nanopartícula (Figura 4.17) las larvas no bioacumulan tanto metal, observándose una mortalidad del 100% sólo a las 96 horas y en los tanques de máxima concentración.

Las Figuras 4.18 y 4.19 recogen estos resultados pero relacionando la concentración de plata medida en las aguas, en el eje de abcisas, frente a la concentración medida en las larvas de dorada en el eje de ordenadas. Para que sea más fácil el uso de concentraciones tan diferentes y poder representar la tendencia de los resultados, se han realizado las figuras con ejes logarítmicos, y se ha expresado la concentración de plata como $\text{Log}(100 \times [\text{plata}])$ ($\mu\text{g L}^{-1}$).

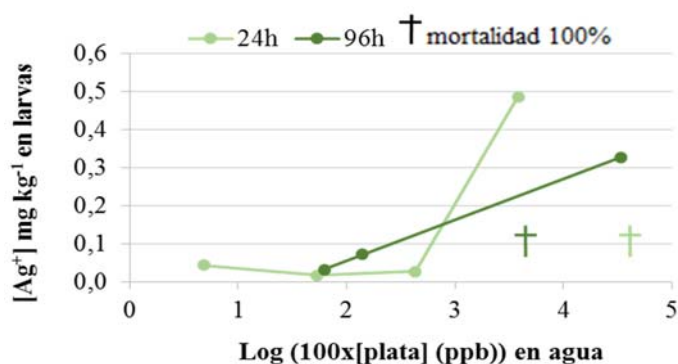


Figura 4.18. Concentración de Ag (mg kg^{-1}) en las larvas de dorada expuestas 24 y 96 horas a concentraciones medidas de Ag^+ (plata iónica) en agua

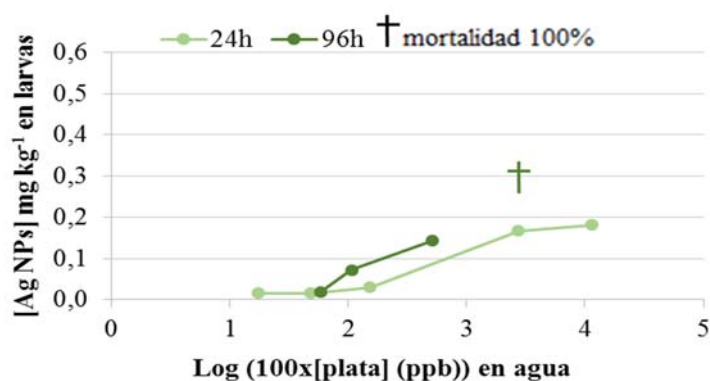


Figura 4.19. Concentración de Ag (mg kg^{-1}) en las larvas de dorada expuestas 24 y 96 horas a concentraciones medidas de AgNPs en agua

Al observar dichas figuras no se encuentran diferencias claras en la bioacumulación de larvas cuando las concentraciones medidas en las aguas de Ag^+ o AgNPs son bajas (0; 0,001 y 0,01 mg L^{-1}). Sin embargo, si se aprecia un aumento importante con la concentración siguiente de 0,1 mg L^{-1} , que es más notable cuando las

larvas están expuestas durante 24 horas. Comparando ambas figuras, se comprueba que las larvas tienden a acumular una mayor concentración de metal en forma de Ag^+ que en forma de nanopartículas, tal y como se mencionó para las Figuras 4.16 y 4.17. Igualmente, se observa cierta mortalidad en las pruebas con las mayores concentraciones de plata iónica.

Se puede concluir que si estos organismos se exponen de manera continuada a este metal, aunque la mortalidad pueda ser más o menos tardía, se producirá acumulación de plata en las larvas, que podría transmitirse a lo largo de la cadena trófica, pudiendo tener efectos toxicológicos en los organismos. Esto parece ocurrir tanto en su forma iónica como en forma de nanopartículas, aunque en este segundo caso el efecto es menor, necesitando más concentración y tiempo de exposición.

En las Tablas XIII y XIV del apartado de anexos quedan recogidos los datos con los que se han realizado las gráficas de este apartado.

4.3. Validación de los resultados analíticos

La validación de los métodos de análisis empleados fue realizada con objeto de confirmar la idoneidad de la metodología empleada según el nivel de calidad exigido en los resultados. Con todo ello se persigue, por tanto, conocer la calidad de los resultados y su validez. Para ello se evaluó el sesgo de las medidas, se cuantificaron muestras “blanco” de las metodologías utilizadas y se calcularon los límites de detección.

4.3.1. Sesgo de las medidas de Ag

El sesgo se evalúa mediante la comparación de la media de un número n de resultados del método con un valor de referencia adecuado. El empleo de materiales de referencia certificados es la técnica más adecuada para ello [Morrillas y col., 2016].

El cálculo del sesgo para los análisis de plata en agua por ICP-MS se realizó empleando dos muestras de referencia de aguas de estuario: Ref-TMDA-64.2//Lote 0313//CRM environment Canada//500 mL (valor indicativo: 13 ppb de Ag) y Ref-TM-DWS.2//Lot No 0809//400 mL (valor certificado: $9,97 \pm 0,5$ ppb de Ag). A partir de estos

valores y las medidas del análisis de estas dos muestras de referencia, se obtuvo el error relativo del análisis, que fue de 2,4% y 0,6%, respectivamente.

Para el cálculo del sesgo en la determinación de plata por AAS con horno de grafito en las muestras de larvas se empleó la muestra de referencia certificada DOLT-3 (hígado de cazón, *Squalus acanthias*) (valor certificado: $4 \pm 0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ag). El error relativo obtenido fue del 7,5%.

4.3.2. Análisis de muestras “blanco” y cálculo del límite de detección (LD)

Durante los análisis y para comprobar que las disoluciones utilizadas no se alteran o contaminan por su manipulación, se utilizaron diversas muestras “blanco” del método a emplear. La cuantificación de los blancos se hacía de manera rutinaria cada 6 muestras aproximadamente, o cada vez que las concentraciones esperadas en las distintas muestras a analizar variaban de forma muy brusca. Si la señal de estos blancos no era la esperada, el equipo de análisis era sometido a varios minutos de limpieza con agua Milli-Q acidificada con HNO_3 concentrado (Suprapur), para que los valores no se viesan alterados por efectos de memoria en las conducciones.

El límite de detección hace referencia a la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. Intuitivamente, el LD es la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra que es posible discriminar de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco, es decir, de una muestra sin analito presente [Boqué, R. 2004] y se halla a través de la siguiente fórmula, donde σ hace referencia a la desviación estándar de los blancos:

$$LD = 3 * \sigma$$

Los valores de los límites de detección calculados para las técnicas empleadas fueron:

- a) LD para el análisis de Ag por ICP-MS en muestras de agua de mar: $0,041 \pm 0,013 \mu\text{g L}^{-1}$ (ver Tabla XV de los anexos).
- b) LD para el análisis de Ag por AAS con horno de grafito en muestras de larvas digeridas: $0,016 \pm 0,0008 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabla XVI del apartado de anexos).

5. Conclusiones

1-. Se han realizado dos ensayos de toxicidad aguda con exposición de larvas de dorada a plata durante cinco días, adicionando al agua de los tanques plata iónica (Ag^+) y AgNPs. De forma paralela, se ha estudiado la evolución de las nanopartículas adicionadas en agua de mar sin la presencia de las larvas. En ambos casos, los parámetros físico-químicos presentan unos valores adecuados durante los estudios.

2-. En presencia de larvas, se observa cómo la concentración de plata medida en las aguas de los experimentos con Ag^+ se ajusta más a los valores nominales de lo que lo hace al adicionarse AgNPs; también, conforme va pasando el tiempo, esta diferencia es más notoria, siendo las concentraciones medidas en el agua menores que las esperadas, lo que puede indicar fenómenos de precipitación del metal.

3-. En el caso de la concentración de AgNPs en los experimentos sin larvas, los resultados sugieren que se produce una evolución entre el primer y segundo día, disminuyendo en un 90% su contenido en aguas, permaneciendo en forma iónica. Al realizar el estudio de la distribución de tamaños por DLS y el espectro UV-Visible, se comprueba que la renovación del agua de los tanques es una forma de evitar este efecto.

4-. En cuanto al análisis del contenido de plata acumulado en las larvas, se observa que aquellas expuestas a la forma iónica de la plata bioacumulan mucho más metal que las sometidas a los experimentos en los que se adicionó AgNPs. Este fenómeno se aprecia en mayor medida conforme aumenta la concentración en ambas formas del metal. Además, la mortalidad de las larvas en los experimentos con nanopartículas se produce de manera más tardía que en aquellos que contienen Ag^+ , terminando en un 100% de mortalidad con el tiempo de exposición máximo.

5-. Por tanto, con este trabajo se evidencia que la exposición de larvas de dorada de forma continua, tanto a plata iónica como a nanopartículas de plata, produce bioacumulación significativa, lo que puede influir así en la cadena trófica. Sin embargo, el tiempo de exposición y la concentración de metal necesario para que se produzca la mortalidad de las larvas es menor en el caso de Ag^+ que en el caso de estar como AgNPs.

Bibliografía

- Agilent Technologies, Inc. (2018). *The Role of Chemical Modifiers in Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, Technical Overview. 5991-9155EN.
- Aguilar M. A. 2009. Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre *colletotrichum Gloesporioides*. Tesis doctoral.
- Alomary, A. A., & Belhadj, S. (2007). Determination of heavy metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) by ICP-OES and their speciation in Algerian Mediterranean Sea sediments after a five-stage sequential extraction procedure. *Environmental monitoring and assessment*, 135(1-3), 265-280.
- Andreani, G., Santoro, M., Cottignoli, S., Fabbri, M., Carpenè, E., & Isani, G. (2008). Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Science of the total environment*, 390(1), 287-294.
- Auguste, M., Ciacci, C., Balbi, T., Brunelli, A., Caratto, V., Marcomini, A., ... Canesi, L. (2018). Effects of nanosilver on *Mytilus galloprovincialis* hemocytes and early embryo development. *Aquatic Toxicology*, 203(August), 107–116.
- Ávalos, A., Haza, A. I., & Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: Aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7(2), 1-23.
- Beatty, R. D., & Kerber, J. D. (1978). *Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry* (p. 27). USA: Perkin-Elmer.
- Berne, B. I., & Recora, R. (2000). *Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology and Physics*.-Dover Publications Inc. Minneola.
- Bondarenko, O., & Juganson, K. (2013). Angela Ivask, Kaja Kasemets, Monika Mortimer & Anne Kahru. *Arch Toxicol*, 87, 1181-1200.
- Boqué, R. (2004). El límite de detección de un método analítico. *Técnicas de laboratorio*, 296, 878-81.
- Bradl, H. B. (2005). Sources and origins of heavy metals. In *Interface Science and Technology* (Vol. 6, pp. 1-27). Elsevier.
- Cambier, S., Røgeberg, M., Georgantzopoulou, A., Serchi, T., Karlsson, C., Verhaegen, S. & Audinot, J. N. (2018). Fate and effects of silver nanoparticles on early life-stage development of zebrafish (*Danio rerio*) in comparison to silver nitrate. *Science of The Total Environment*, 610-611, 972-982.

- Canesi, L., Ciacci, C., & Balbi, T. (2015). Interactive effects of nanoparticles with other contaminants in aquatic organisms: Friend or foe?. *Marine environmental research*, 111, 128-134.
- Cao, G. (2004). *Nanostructures & nanomaterials: synthesis, properties & applications*. Imperial college press.
- Censi, P., Spoto, S. E., Saiano, F., Sprovieri, M., Mazzola, S., Nardone, G., & Ottonello, D. (2006). Heavy metals in coastal water systems. A case study from the northwestern Gulf of Thailand. *Chemosphere*, 64(7), 1167-1176.
- Chen, C. Y., & Chiang, C. L. (2008). Preparation of cotton fibers with antibacterial silver nanoparticles. *Materials Letters*, 62(21-22), 3607-3609.
- Choi, Y., Kim, H. A., Kim, K. W., & Lee, B. T. (2018). Comparative toxicity of silver nanoparticles and silver ions to Escherichia coli. *Journal of Environmental Sciences*, 66, 50-60.
- Ciencia y desarrollo revista (2006). Conacyt. *Nanotecnología. Nanopartículas metálicas*. http://www.cyd.conacyt.gob.mx/195/Articulos/Nano_Metalicas.html
- Cohen, M. S., Stern, J. M., Vanni, A. J., Kelley, R. S., Baumgart, E., Field, D., & Summerhayes, I. C. (2007). In vitro analysis of a nanocrystalline silver-coated surgical mesh. *Surgical infections*, 8(3), 397-404.
- Coto Reyes, J. Ó. (2015). Estudios de bioacumulación de un metal de interés en contaminación ambiental (plomo) en larvas de lubina de gran valor comercial.
- Cruz, D. A., & Rodríguez, M. C. (2012). Nanopartículas metálicas y plasmones de superficie: Una relación profunda. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 67-78.
- Delgado, M. N. G., Barrenetxea, C. O., Serrano, A. P., Blanco, J. M. A., & Vidal, F. J. R. (2004). *Contaminación ambiental: una visión desde la química*. Editorial Paraninfo.
- Díaz de Alba, M. I. (2013). *Avances en el control de la contaminación por metales: nuevas metodologías de análisis y especiación metálica en sistemas acuáticos. Estudios en la Bahía de Algeciras*, 1–562. Tesis doctoral.
- Eisler, R. (2009). *Compendium of Trace Metals and Marine Biota: Volume 1: Plants and Invertebrates* (Vol. 1). Elsevier.
- Elechiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H., & Yacaman, M. J. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of nanobiotechnology*, 3(1), 6.
- European Commission. (2011). Recomendación de la Comisión de 18 de Octubre de

- 2011 relativa a la definición de nanomaterial. *Diario Oficial de La Unión Europea*, 696/EU(2005), 275/38-275/40.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en
- Gomez-Mendikute, A., & Cajaraville, M. P. (2003). Comparative effects of cadmium, copper, paraquat and benzo [a] pyrene on the actin cytoskeleton and production of reactive oxygen species (ROS) in mussel haemocytes. *Toxicology in vitro*, 17(5-6), 539-546.
- Gómez Quintero, T., Arroyo Ornelas, M. A., Hernandez Padrón, G., & Acosta Torres, L. S. (2013). Nanopartículas de plata: Aplicaciones biomédicas. *Química Hoy*, 3(3).
- Gutiérrez, C. (2005). Las nanopartículas: pequeñas estructuras con gran potencial. *Contacto Nuclear*, 39, 24-29.
- Gutierrez-Praena, D., Jos, A., Pichardo, S., Puerto, M., Sánchez-Granados, E., Grilo, A., & Camean, A. M. (2009). Nuevos riesgos tóxicos por exposición a nanopartículas. *Revista de Toxicología*, 26(2-3).
- Hashimoto, Y., Takeuchi, S., Mitsunobu, S., & Ok, Y. S. (2017). Chemical speciation of silver (Ag) in soils under aerobic and anaerobic conditions: Ag nanoparticles vs. ionic Ag. *Journal of hazardous materials*, 322, 318-324.
- Holler, J. S., Fowler, B. A., & Nordberg, G. F. (2015). Silver. In *Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition)* (pp. 1209-1216).
- Howe, P. D., Dobson, S., & World Health Organization. (2002). Silver and silver compounds: environmental aspects.
- Huang, Z., Zeng, Z., Chen, A., Zeng, G., Xiao, R., Xu, P. & Huang, T. (2018). Differential behaviors of silver nanoparticles and silver ions towards cysteine: Bioremediation and toxicity to *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere*, 203, 199-208.
- Israelachvili, J. N. (2011). *Intermolecular and surface forces*. Academic press.
- Jia, Y., Wang, L., Qu, Z., Wang, C. & Yang, Z. (2017). Effects on heavy metal accumulation in freshwater fishes: species, tissues, and sizes. *Research article, Environ Science Pollution Research*, 24 (10), 9379–9386.
- Jiang, H. S., Yin, L., Ren, N. N., Xian, L., Zhao, S., Li, W., & Gontero, B. (2017). The effect of chronic silver nanoparticles on aquatic system in microcosms. *Environmental Pollution*, 223, 395-402.

- Johari, S. A., Sarkheil, M., Tayemeh, M. B., & Veisi, S. (2018). Influence of salinity on the toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) in halophilic microalgae, *Dunaliella salina*. *Chemosphere*.
- Johnston, H. J., Hutchison, G., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., & Stone, V. (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical reviews in toxicology*, 40(4), 328-346.
- Jones, S. J. (2009). Environmental Toxicology: Aquatic. In *Information Resources in Toxicology (Fourth Edition)* (pp. 203-216).
- Kaya, E. D., Söyüt, H., & Beydemir, Ş. (2015). The toxicological impacts of some heavy metals on carbonic anhydrase from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) gills. *Environmental toxicology and pharmacology*, 39(2), 825-832.
- Kobielska, P. A., Howarth, A. J., Farha, O. K., & Nayak, S. (2018). Metal–organic frameworks for heavy metal removal from water. *Coordination Chemistry Reviews*, 358, 92-107.
- Lacave, J. M., Vicario-Parés, U., Bilbao, E., Gilliland, D., Mura, F., Dini, L., ... & Orbea, A. (2018). Waterborne exposure of adult zebrafish to silver nanoparticles and to ionic silver results in differential silver accumulation and effects at cellular and molecular levels. *Science of The Total Environment*, 642, 1209-1220.
- Lee, H. Y., Park, H. K., Lee, Y. M., Kim, K., & Park, S. B. (2007). A practical procedure for producing silver nanocoated fabric and its antibacterial evaluation for biomedical applications. *Chemical Communications*, (28), 2959-2961.
- Mahdi, K. N., Peters, R. J., Klumpp, E., Bohme, S., Van der Ploeg, M., Ritsema, C., & Geissen, V. (2017). Silver nanoparticles in soil: aqueous extraction combined with single-particle ICP-MS for detection and characterization. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 7, 24-33.
- Ministerio de Agricultura, alimentación y Medio Ambiente, 2018 <https://www.mapama.gob.es/app/jacumar/especies/Documentos/Dorada.pdf>
- Morillas, P. P., Terra, A. I., Uribe, C., Mastromonaco, G., Prieto, J. L., & Torres, M. (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos-Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados: Eurolab España.
- Munari, M., Sturve, J., Frenzilli, G., Sanders, M. B., Brunelli, A., Marcomini, A., & Lyons, B. P. (2014). Genotoxic effects of CdS quantum dots and Ag₂S

- nanoparticles in fish cell lines (RTG-2). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 775, 89-93.
- Nordberg, G., & Nordberg, G. (2017). Metales: Propiedades químicas y toxicidad productos químicos. línea: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/63.pdf> Última revisión mayo.
- Nordberg, M., Templeton, D. M., Andersen, O., & Duffus, J. H. (2009). Glossary of terms used in Ecotoxicology (IUPAC Recommendations 2009). *Pure and Applied Chemistry*, 81(5), 829-970.
- Oyewole Salawu, M., Timilehin Sunday, E. & Hussein Oyelola Bukoye, O. (2018). Bioaccumulative activity of *Ludwigia peploides* on heavy metals-contaminated water. *Environmental Technology & Innovation*, 10, 324-334.
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 73(6), 1712-1720.
- Pardha-Saradhi, P., Shabnam, N., Sharmila, P., Ganguli, A. K., & Kim, H. (2018). Differential sensitivity of light-harnessing photosynthetic events in wheat and sunflower to exogenously applied ionic and nanoparticulate silver. *Chemosphere*, 194, 340-351
- Quevedo, O., Gómez, J., Ramírez, C., Estrada, T., Moreno, C., Mendiguchía, C., & Alfonso, M. S. P. (2012). Estudio de la contaminación por metales en sedimentos acuáticos de la Bahía de Matanzas. *Quim. Nova*, 35(5), S1.
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27(1), 76-83.
- Ratner, M. A., & Ratner, D. (2003). *Nanotechnology: A gentle introduction to the next big idea*. Prentice Hall Professional.
- Rajeshkumar, S., & Li, X. (2018). Bioaccumulation of heavy metals in fish species from the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Toxicology reports*, 5, 288-295.
- Riu, J., Maroto, A., & Rius, F. X. (2006). Nanosensors in environmental analysis. *Talanta*, 69(2), 288-301.
- Rodier, J. (2011). *Análisis del agua*. Omega, 9, 1584.
- Sánchez Moreno, M. (2017). Nanopartículas de plata: preparación, caracterización y propiedades con aplicación en inocuidad de los alimentos.

- Sandoval, A. J. (2007). Fundamentos de piscicultura continental y calidad de aguas naturales. *Fundación Eco-Ambiental de Colombia*.
- Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis*. Cengage Learning.
- Smita, S., Gupta, S. K., Bartonova, A., Dusinska, M., Gutleb, A. C., & Rahman, Q. (2012). Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach. *Environmental Health*, 11(1), S13.
- Søndergaard, J., Asmund, G., & Larsen, M. M. (2015). Trace elements determination in seawater by ICP-MS with on-line pre-concentration on a Chelex-100 column using a 'standard' instrument setup. *MethodsX*, 2, 323-330.
- Sun, Y., & Xia, Y. (2002). Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*, 298(5601), 2176-2179.
- Tripathi, A., Liu, S., Singh, P. K., Kumar, N., Pandey, A. C., Tripathi, D. K., & Sahi, S. (2017). Differential phytotoxic responses of silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticle (AgNps) in *Cucumis sativus* L. *Plant Gene*, 11, 255-264.
- Velicogna, J. R., Schwertfeger, D. M., Jesmer, A. H., Scroggins, R. P., & Princz, J. I. (2017). The bioaccumulation of silver in *Eisenia andrei* exposed to silver nanoparticles and silver nitrate in soil. *NanoImpact*, 6, 11-18.
- Yarsan, E., & Yipel, M. (2013). The important terms of marine pollution Biomarkers and biomonitoring, bioaccumulation, bioconcentration, biomagnification. *J Mol Biomark Diagn S*, 1, 2.
- Yipel, M., Tekeli, İ. O., İşler, C. T., & Altuğ, M. E. (2017). Heavy metal distribution in blood, liver and kidneys of Loggerhead (*Caretta caretta*) and Green (*Chelonia mydas*) sea turtles from the Northeast Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 125(1-2), 487-491.
- Zhou, J., Ma, D., Pan, J., Nie, W., & Wu, K. (2008). Application of multivariate statistical approach to identify heavy metal sources in sediment and waters: a case study in Yangzhong, China. *Environmental Geology*, 54(2), 373-380.
- Zohar, Y., Abraham, M., & Gordin, H. (1978). The gonadal cycle of the captivity-reared hermaphroditic teleost *Sparus aurata* (L.) during the first two years of life. In *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* (Vol. 18, No. 4, pp. 877-882). EDP Sciences.

- Zhang, W., Xiao, B., & Fang, T. (2018). Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: Mechanism, morphology and toxicity. *Chemosphere*, 191, 324-334.
- Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1534.
- Zhang, Y. Y., & Sun, J. (2007). A study on the bio-safety for nano-silver as anti-bacterial materials. *Zhongguo yi liao qi xie za zhi= Chinese journal of medical instrumentation*, 31(1), 36-8.

Anexos

Tabla I. Medias de los parámetros físico-químicos de los tanques de concentración 0 mg L⁻¹ medidas a lo largo de los 5 días que duraron los experimentos de Ag⁺ y AgNPs con presencia de larvas de dorada y AgNPs sin ellas.

| Horas | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| Temperatura (°C) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 24,85 ± 0,25 | 25,14 ± 0,11 | 24,07 | 23,55 | |
| NPs con larvas | 24,19 ± 0,17 | 24,68 ± 0,06 | 24,69 ± 0,21 | 23,56 ± 0,10 | 23,49 |
| NPs sin larvas | 22,89 | 23,44 | 21,57 | 22,98 | 22,42 |
| pH | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 7,93 ± 0,21 | 8,03 ± 0,12 | 8,08 | 7,79 | |
| NPs con larvas | 7,67 ± 0,31 | 8,03 ± 0,17 | 7,87 ± 0,08 | 7,76 ± 0,28 | 7,61 |
| NPs sin larvas | 7,8 | 7,94 | 8,15 | 8,16 | 8,18 |
| O₂ disuelto (mg L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 7,29 ± 0,52 | 7,46 ± 0,35 | 8,40 | 7,81 | |
| NPs con larvas | 7,46 ± 0,71 | 7,84 ± 0,30 | 7,60 ± 0,08 | 7,26 ± 1,31 | 6,64 |
| NPs sin larvas | 6,5 | 6,96 | 6,77 | 6,99 | 6,37 |
| Conductividad (mS cm⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 45,64 ± 0,19 | 48,98 ± 0,29 | 53,45 | 53,73 | |
| NPs con larvas | 45,01 ± 0,21 | 48,27 ± 0,22 | 52,79 ± 1,13 | 52,66 ± 0,35 | 68,62 |
| NPs sin larvas | 40,25 | 42,42 | 40,29 | 41,81 | 55,72 |
| TDS (g L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 22,92 ± 0,15 | 24,42 ± 0,10 | 27,21 | 27,41 | |
| NPs con larvas | 22,86 ± 0,13 | 24,29 ± 0,09 | 26,76 ± 0,39 | 27,07 ± 0,13 | 35,32 |
| NPs sin larvas | 20,96 | 21,86 | 21,55 | 21,74 | 29,33 |
| Salinidad (g L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 29,91 ± 0,62 | 31,89 ± 0,15 | 36,03 | 36,34 | |
| NPs con larvas | 29,63 ± 0,19 | 31,70 ± 0,13 | 35,35 ± 0,57 | 35,83 ± 0,20 | 40,48 |
| NPs sin larvas | 26,93 | 28,21 | 27,8 | 28,05 | 31,25 |

Tabla II. Medias de los parámetros físico-químicos de los tanques de concentración 0,001 mg L⁻¹ medidas a lo largo de los 5 días que duraron los experimentos de Ag⁺ y AgNPs con presencia de larvas de dorada y AgNPs sin ellas.

| Horas | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Temperatura (°C) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 25,49 ± 0,22 | 25,59 ± 0,20 | 24,54 | 24,51 | 23,44 |
| NPs con larvas | 25,02 ± 0,55 | 24,69 ± 0,38 | 24,35 ± 0,16 | 23,85 ± 0,08 | 23,88 ± 0,10 |
| pH | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 7,89 ± 0,07 | 7,93 ± 0,09 | 7,86 | 7,91 | 7,81 |
| NPs con larvas | 7,81 ± 0,23 | 7,99 ± 0,16 | 8,04 ± 0,03 | 7,95 ± 0,04 | 7,50 ± 0,09 |
| O₂ disuelto (mg L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 7,59 ± 0,33 | 7,40 ± 1,13 | 7,90 | 7,19 | 7,66 |
| NPs con larvas | 7,43 ± 0,64 | 7,23 ± 1,07 | 7,89 ± 0,26 | 8,11 ± 0,03 | 5,63 ± 0,15 |
| Conductividad (mS cm⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 46,61 ± 0,30 | 48,95 ± 0,15 | 53,84 | 53,85 | 70,57 |
| NPs con larvas | 45,53 ± 0,56 | 47,99 ± 0,37 | 53,09 ± 0,21 | 52,72 ± 0,35 | 69,02 ± 0,19 |
| TDS (g L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 23,09 ± 0,08 | 24,20 ± 0,12 | 25,55 | 27,18 | 35,66 |
| NPs con larvas | 22,76 ± 0,13 | 24,08 ± 0,14 | 26,88 ± 0,03 | 26,95 ± 0,13 | 35,26 ± 0,16 |
| Salinidad (g L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 29,94 ± 0,11 | 31,56 ± 0,18 | 35,03 | 35,98 | 40,99 |
| NPs con larvas | 29,47 ± 0,18 | 31,40 ± 0,21 | 35,53 ± 0,04 | 35,65 ± 0,20 | 40,37 ± 0,26 |

Tabla III. Medias de los parámetros físico-químicos de los tanques de concentración 0,01 mg L⁻¹ medidas a lo largo de los 5 días que duraron los experimentos de Ag⁺ y AgNPs con presencia de larvas de dorada y AgNPs sin ellas.

| Horas | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 |
|---|--------------|--------------|-------|-------|-------|
| Temperatura (°C) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 25,48 ± 0,26 | 25,74 ± 0,22 | 24,90 | 24,53 | 24,36 |
| NPs con larvas | 24,77 ± 0,24 | 24,81 ± 0,13 | 24,25 | 24,18 | 23,53 |
| pH | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 7,77 ± 0,16 | 7,78 ± 0,13 | 7,80 | 7,76 | 7,56 |
| NPs con larvas | 7,87 ± 0,21 | 7,97 ± 0,14 | 7,91 | 7,44 | 7,40 |
| O₂ disuelto (mg L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 7,17 ± 0,33 | 6,98 ± 0,78 | 8,25 | 7,28 | 5,99 |
| NPs con larvas | 7,52 ± 0,30 | 7,80 ± 0,39 | 7,16 | 6,22 | 4,69 |
| Conductividad (mS cm⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 46,29 ± 0,35 | 48,49 ± 0,49 | 53,31 | 53,74 | 68,54 |
| NPs con larvas | 46,24 ± 0,36 | 47,98 ± 0,17 | 53,43 | 53,99 | 69,49 |
| TDS (g L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 23,02 ± 0,21 | 23,90 ± 0,16 | 26,71 | 27,11 | 34,69 |
| NPs con larvas | 23,07 ± 0,09 | 24,08 ± 0,12 | 27,10 | 27,42 | 35,74 |
| Salinidad (g L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 29,85 ± 0,31 | 31,11 ± 0,22 | 35,26 | 35,87 | 39,46 |
| NPs con larvas | 29,93 ± 0,15 | 31,39 ± 0,17 | 35,87 | 36,34 | 41,14 |

Tabla IV. Medias de los parámetros físico-químicos de los tanques de concentración 0,1 mg L⁻¹ medidas a lo largo de los 5 días que duraron los experimentos de Ag⁺ y AgNPs con presencia de larvas de dorada y AgNPs sin ellas.

| Horas | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 |
|---|--------------|--------------|--------------|-------|-------|
| Temperatura (°C) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 25,18 ± 0,21 | 25,74 ± 0,07 | 24,68 | 24,52 | 24,49 |
| NPs con larvas | 24,51 ± 0,30 | 24,64 ± 0,14 | 24,60 ± 0,33 | 23,64 | 23,56 |
| NPs sin larvas | 22,42 | 23,75 | 21,81 | 21,53 | 21,52 |
| pH | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 7,78 ± 0,20 | 7,88 ± 0,15 | 7,68 | 7,74 | 7,91 |
| NPs con larvas | 7,66 ± 0,59 | 7,97 ± 0,16 | 7,77 ± 0,35 | 8,01 | 7,39 |
| NPs sin larvas | 8,29 | 8,42 | 8,43 | 8,19 | 8,3 |
| O₂ disuelto (mg L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 7,70 ± 0,42 | 6,92 ± 0,94 | 7,06 | 7,35 | 7,76 |
| NPs con larvas | 7,48 ± 0,53 | 7,51 ± 0,46 | 7,18 ± 1,51 | 8,07 | 4,67 |
| NPs sin larvas | 6,45 | 6,68 | 6,89 | 6,94 | 6,34 |
| Conductividad (mS cm⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 43,68 ± 5,00 | 49,01 ± 0,07 | 53,50 | 53,44 | 69,70 |
| NPs con larvas | 45,20 ± 0,52 | 47,96 ± 0,34 | 52,59 ± 0,60 | 53,56 | 68,99 |
| NPs sin larvas | 40,11 | 42,49 | 39,12 | 41,05 | 55,92 |
| TDS (g L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 23,02 ± 0,13 | 24,17 ± 0,03 | 26,92 | 26,97 | 35,19 |
| NPs con larvas | 22,80 ± 0,11 | 24,15 ± 0,15 | 26,70 ± 0,18 | 27,49 | 35,47 |
| NPs sin larvas | 21,09 | 21,76 | 21,17 | 21,98 | 29,94 |
| Salinidad (g L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 29,84 ± 0,19 | 31,50 ± 0,05 | 35,58 | 35,66 | 40,24 |
| NPs con larvas | 29,54 ± 0,15 | 31,50 ± 0,22 | 35,28 ± 0,28 | 36,46 | 40,71 |
| NPs sin larvas | 27,12 | 28,07 | 27,21 | 28,41 | 32,19 |

Tabla V. Medias de los parámetros físico-químicos de los tanques de concentración 1 mg L⁻¹ medidas a lo largo de los 5 días que duraron los experimentos de Ag⁺ y AgNPs con presencia de larvas de dorada y AgNPs sin ellas.

| Horas | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 |
|---|--------------|--------------|-------|-------|-------|
| Temperatura (°C) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 25,04 ± 0,04 | 25,13 ± 0,47 | 25,02 | 24,45 | 24,25 |
| NPs con larvas | 24,54 ± 0,22 | 24,79 ± 0,20 | 23,91 | | |
| NPs sin larvas | 23,44 | 23,66 | 21,84 | 20,9 | 21,59 |
| pH | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 7,99 ± 0,26 | 7,72 ± 0,26 | 7,61 | 8,07 | 8,20 |
| NPs con larvas | 7,31 ± 0,97 | 7,94 ± 0,11 | 7,98 | | |
| NPs sin larvas | 8,32 | 8,55 | 8,45 | 8,17 | 8,28 |
| O₂ disuelto (mg L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 7,49 ± 0,72 | 5,60 ± 0,91 | 7,48 | 8,03 | 7,89 |
| NPs con larvas | 7,44 ± 0,62 | 7,49 ± 0,17 | 7,78 | | |
| NPs sin larvas | 6,22 | 6,63 | 6,52 | 7,08 | 6,23 |
| Conductividad (mS cm⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 45,86 ± 0,18 | 48,73 ± 0,21 | 53,40 | 53,20 | 70,27 |
| NPs con larvas | 45,39 ± 0,57 | 48,38 ± 0,11 | 52,52 | | |
| NPs sin larvas | 40,42 | 42,54 | 39,84 | 41,17 | 56,13 |
| TDS (g L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 22,91 ± 0,08 | 24,31 ± 0,11 | 26,69 | 26,88 | 35,64 |
| NPs con larvas | 22,89 ± 0,20 | 24,29 ± 0,13 | 26,82 | | |
| NPs sin larvas | 20,83 | 21,83 | 21,19 | 22,32 | 30,01 |
| Salinidad (g L⁻¹) | | | | | |
| Ag ⁺ con larvas | 29,69 ± 0,12 | 31,72 ± 0,18 | 35,23 | 35,53 | 40,96 |
| NPs con larvas | 29,68 ± 0,28 | 31,70 ± 0,20 | 35,45 | | |
| NPs sin larvas | 26,73 | 28,16 | 27,28 | 28,92 | 32,29 |

Tabla VI. Variación del COD durante los ensayos (con larvas) para las distintas concentraciones de Ag⁺ y AgNPs.

| Concentración nominal (mg L ⁻¹) | 0 horas | 24 horas | 96 horas |
|---|---------|-------------|----------|
| Ag⁺ | | | |
| 0 | 0,57 | 1,01 ± 0,27 | - |
| 0,001 | 0,57 | 0,74 ± 0,19 | 0,99 |
| 0,01 | 0,57 | 1,09 ± 0,47 | 1,09 |
| 0,1 | 0,57 | 0,93 ± 0,68 | 0,89 |
| 1 | 0,57 | 2,43 ± 0,41 | 1,22 |
| Ag NPs con larvas | | | |
| 0 | 0,57 | 0,77±0,15 | 0,93 |
| 0,001 | 0,57 | 0,60±0,16 | 0,99 |
| 0,01 | 0,57 | 0,69 ± 0,13 | 1,46 |
| 0,1 | 0,57 | 0,78 ± 0,22 | 1,35 |
| 1 | 0,57 | 0,85 ± 0,17 | - |

Tabla VII. Variación del COD durante los ensayos (sin larvas) para las distintas concentraciones de Ag⁺ y AgNPs.

| Concentración nominal (mg L ⁻¹) | 0 horas | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
|---|---------|----------|----------|----------|----------|
| Ag NPs sin larvas | | | | | |
| 0 | 0,53 | 0,39 | 0,40 | 0,30 | 0,19 |
| 0,1 | 0,53 | 0,39 | 0,39 | 0,42 | 0,24 |
| 1 | 0,53 | 0,47 | 0,27 | 0,22 | 0,25 |

Tabla VIII. Resultados medios del análisis de las aguas mediante ICP-masas de cada grupo de tanques con la misma concentración para los bioensayos de Ag⁺ en presencia de larvas.

| Concentración nominal (mg L ⁻¹) | Concentración real (mg L ⁻¹) | | |
|---|--|----------|----------|
| | 0 horas | 24 horas | 96 horas |
| 0 | 1,70E-04 | 4,8E-05 | † |
| 0,001 | 6,87E-04 | 5,4E-04 | 6,2E-04 |
| 0,01 | 7,00E-03 | 4,3E-03 | 1,4E-03 |
| 0,1 | 7,00E-02 | 3,8E-02 | † |
| 1 | 8,69E-01 | † | 3,4E-01 |

Tabla IX. Resultados medios del análisis de las aguas mediante ICP-masas de cada grupo de tanques con la misma concentración para los bioensayos de AgNPs en presencia de larvas.

| Concentración nominal (mg L ⁻¹) | Concentración real (mg L ⁻¹) | | |
|---|--|----------|----------|
| | 0 horas | 24 horas | 96 horas |
| 0 | 1,1E-04 | 1,7E-04 | † |
| 0,001 | 7,1E-04 | 4,8E-04 | 5,9E-04 |
| 0,01 | 3,5E-03 | 1,5E-03 | 1,1E-03 |
| 0,1 | 3,3E-02 | 2,7E-02 | 5,1E-03 |
| 1 | 4,3E-01 | 1,1E-01 | † |

Tabla X. Resultados medios del análisis de las aguas mediante ICP-masas de cada grupo de tanques con la misma concentración para los bioensayos de AgNPs sin tratar sin larvas.

| Concentración nominal (mg L ⁻¹) | Concentración real (mg L ⁻¹) | | | | |
|---|--|----------|----------|----------|----------|
| | 0 horas | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
| 0 | 1,00E-04 | 3,70E-04 | 6,00E-05 | 6,00E-05 | 0 |
| 0,1 | 3,60E-02 | 1,02E-02 | 1,01E-02 | 8,81E-03 | 1,23E-02 |
| 1 | 4,48E-01 | 2,44E-01 | 1,18E-01 | 1,25E-01 | 1,78E-01 |

Tabla XI. Resultados medios del análisis de las aguas mediante ICP-masas de cada grupo de tanques con la misma concentración para los bioensayos de AgNPs filtradas sin larvas.

| Concentración nominal (mg L ⁻¹) | Concentración real (mg L ⁻¹) | | | | |
|---|--|----------|----------|----------|----------|
| | 0 horas | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
| 0 | 5,60E-04 | 1,50E-04 | 2,10E-04 | 0 | 0 |
| 0,1 | 7,79E-03 | 8,67E-03 | 9,50E-03 | 6,51E-03 | 1,05E-02 |
| 1 | 9,08E-02 | 1,34E-01 | 1,19E-01 | 1,72E-01 | 1,48E-01 |

Tabla XII. Resultados medios del análisis de las aguas mediante ICP-masas de cada grupo de tanques con la misma concentración para los bioensayos de AgNPs centrifugadas sin larvas.

| Concentración nominal (mg L ⁻¹) | Concentración real (mg L ⁻¹) | | | | |
|---|--|----------|----------|----------|----------|
| | 0 horas | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
| 0 | 3,30E-04 | 2,30E-04 | 1,60E-04 | 5,00E-05 | 3,00E-05 |
| 0,1 | 8,77E-03 | 9,96E-03 | 1,08E-02 | 1,10E-02 | 1,67E-02 |
| 1 | 9,01E-02 | 1,77E-01 | 1,48E-01 | 1,61E-01 | 1,75E-01 |

Tabla XIII. Resultados medios del análisis de la concentración de Ag⁺ en las larvas de los bioensayos de cada grupo de tanques con la misma concentración.

| Concentración nominal (mg L ⁻¹) | Concentración real (mg L ⁻¹) | |
|---|--|----------|
| | 24 horas | 96 horas |
| 0 | 4,34E-05 | † |
| 0,001 | 1,57E-05 | 3,16E-05 |
| 0,01 | 2,71E-05 | 7,16E-05 |
| 0,1 | 4,87E-04 | † |
| 1 | † | 3,27E-04 |

Tabla XIV. Resultados medios del análisis de la concentración de AgNPs en las larvas de los bioensayos de cada grupo de tanques con la misma concentración.

| Concentración nominal (mg L ⁻¹) | Concentración real (mg L ⁻¹) | |
|---|--|----------|
| | 24 horas | 96 horas |
| 0 | 1,57E-05 | † |
| 0,001 | 1,57E-05 | 1,93E-05 |
| 0,01 | 3,03E-05 | 7,24E-05 |
| 0,1 | 1,67E-04 | 1,43E-04 |
| 1 | 1,82E-04 | † |

Tabla XV. Valores empleados para el cálculo del límite de detección (LD) del ICP-masa utilizado para el cálculo del contenido de plata presente en las aguas de los tanques.

| | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--------|
| LD proporcionado por el equipo | 0,026 | 0,017 | 0,037 | 0,028 | 0,002 | 0,016 | 0,013 | -0,002 |
| | 0,024 | 0 | -0,004 | 0,001 | | | | |
| σ | 0,013696936 | | | | | | | |
| 3σ | 0,041090809 | | | | | | | |

Tabla XVI. Valores empleados para el cálculo del límite de detección (LD) aplicado para calcular el contenido de plata presente en las larvas.

| | | | | | | | |
|---------------------|---|---------|--------|---------|--------|--------|---|
| Blancos de la recta | 0,0015 | 0,0018 | 0,0015 | -0,0003 | 0,0015 | 0,0013 | 0 |
| | 0,0013 | -0,0003 | 0,0009 | | | | |
| σ | 0,000809389 | | | | | | |
| Sustitución: | $y = 0,0209x + 0,0007 \rightarrow x = 0,00523394$ | | | | | | |
| 3σ | 0,01570182 | | | | | | |